

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 16 May 2001 (16.05.01)	
International application No. PCT/JP00/06313	Applicant's or agent's file reference KUV-102DP1P2
International filing date (day/month/year) 14 September 2000 (14.09.00)	Priority date (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)
Applicant NISHIMOTO, Ikuo	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 22 February 2001 (22.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Maria Kirchner
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

9T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference KUV-102DP1P2	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06313	International filing date (day/month/year) 14 September 2000 (14.09.00)	Priority date (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/09, C12Q 1/02, 1/68, A61K 38/10, 38/17, A61P 25/28, 43/00		
Applicant KEIO UNIVERSITY		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 February 2001 (22.02.01)	Date of completion of this report 28 May 2001 (28.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: EP, 616032, A2 (Mitsubishi Kasei Corp.) 21 September 1994 (21.09.94) & JP, 6-329551, A & US, 5837835, A

Claims 1-13

Document 1

Document 1 describes a method for screening drugs for the treatment of Alzheimer's disease that determines efficacy by whether or not the drug inhibits nerve cell death, but it does not describe screening lesions and their nearby cells for genes that suppress nerve cell death, and this matter is not obvious to persons skilled in the art. Therefore, the invention set forth in these Claims appears to involve an inventive step.

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 15 JUN 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 KUV-102DP1P2	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06313	国際出願日 (日.月.年) 14. 09. 00	優先日 (日.月.年) 17. 09. 99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12N15/09, C12Q1/02, 1/68, A61K38/10, 38/17, A61P25/28, 43/00		
出願人 (氏名又は名称) 学校法人慶應義塾		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22. 02. 01	国際予備審査報告を作成した日 28. 05. 01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新留 豊	4B 9838
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | |
|-------------------------------------|---|-------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-13 有
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-13 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-13 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1 EP, 616032, A2
(MITSUBISHI KASEI CORP)
21. 9月. 1994 (21. 09. 94)
& JP, 6-329551, A & US, 5837853, A

請求の範囲1-13

文献1

文献1には神経細胞死を阻止するか否かによって有効性を判断するアルツハイマー病の治療薬のスクリーニング方法が記載されているが、神経細胞死を抑制する遺伝子を患部又はその周辺細胞からスクリーニングすることは記載されておらず、当業者に自明であるともいえない。したがって、上記請求の範囲に記載された発明は進歩性を有する。

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 KUV-102 書類記号 DP1P2	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/06313	国際出願日 (日.月.年) 14.09.00	優先日 (日.月.年) 17.09.99
出願人(氏名又は名称) 学校法人慶應義塾		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/02, 1/68, A61K37/02,
A61P25/28, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 616032, A2 (MITSUBISHI KASEI CORP) 21. 9月, 1994 (21. 09. 94) 全文 & JP, 6-329551, A & US, 5837853, A	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 11-146743, A (科学技術振興事業団) 2. 6月. 1999 (02. 06. 99) 全文 (ファミリーなし)	1-13
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, March 1998 Qing Guo et al., "Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: Reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function", p. 3227-3232	1-13

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/21786 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12Q 1/02, 1/68, A61K 38/10, 38/17, A61P 25/28, 43/00
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西本征央 (NISHIMOTO, Ikuo) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06313
- (22) 国際出願日: 2000年9月14日 (14.09.2000)
- (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (30) 優先権データ:
特願平11/264679 1999年9月17日 (17.09.1999) JP
特願2000/201456 2000年6月29日 (29.06.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒108-8345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SCREENING DISEASE DEPRESSANT GENE

(54) 発明の名称: 疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法

(57) Abstract: A method of screening a disease depressant gene and a disease depressant polypeptide and a method of examining the same. A gene having a depressant effect on disease symptoms can be successfully cloned by screening a cDNA expression library having nucleic acids originating in an organism suffering from a disease in association with cell death integrated therein. By using these nucleic acids and polypeptides encoded thereby, the depressant effects on the disease are examined. Thus, a disease depressant gene can be efficiently isolated and selected by screening nucleic acids or polypeptides originating in an organism suffering from a disease in association with cell death.

(57) 要約:

本発明は疾患抑制遺伝子および疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法および検査方法を提供する。細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸を組み込んだcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、疾患症状に対する抑制効果を有する遺伝子をクローニングすることに成功した。また、該核酸およびそれがコードするポリペプチドを用いて、疾患に対する抑制効果の検査を行った。細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸またはポリペプチドをスクリーニングすることにより、疾患に対する抑制遺伝子を効率良く単離、選別することが可能となる。

WO 01/21786 A1



AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法

技術分野

本発明は疾患抑制遺伝子および疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法に関する。

背景技術

ヒトゲノムの解析が進展するにつれ、さまざまな疾患に関連する遺伝子が同定されている。これらの疾患関連遺伝子の解析により、これらの疾患において、疾患を惹起する原因遺伝子(群)の作用（もしくは疾患に関与する正常遺伝子の異常な作用）と、疾患に対して抑制的に働く遺伝子(群)の作用との複雑な関連性が解明されつつある。すなわちヒトに発生するほとんどすべての疾患は、疾患を惹起する異常遺伝子の作用（もしくは疾患に関与する正常遺伝子の異常な作用）とその作用に拮抗する正常の抑制遺伝子との作用均衡の破綻に基づいて発症すると考えられる。このような考え方は、胃潰瘍から神経変性疾患にいたるまで、ほぼすべての疾患に適用できる考え方である。これは、言い換えれば、大部分の疾患について、これを抑制する正常の遺伝子（もしくは疾患抑制遺伝子）が遺伝子ゲノム上に存在する可能性を示唆している。そのような遺伝子を効率的に探索する方法が開発されれば、治療法が見出されていない難治性疾患を含む、様々なヒト疾患について特効的な治療効果を示す遺伝子を発見、同定することができ、もたらされる有益性は疑う余地がない。

従来、特定の疾患に対する抑制遺伝子をスクリーニングするには、該当疾患の原因遺伝子が持つ生化学的な機能を指標に、これを抑制する分子を探索する手法が多く用いられて来た。しかし、そのような方法は、疾患原因遺伝子が持つ生

学的機能が不明の場合は適用できない。また、仮に生化学的機能が同定されていても、その機能が疾患発症の直接原因でない場合は、この機能を基にした薬剤の探索が、疾患を治療できる分子に直接結びつかない可能性もある。実際は、ある遺伝子が、疫学的、遺伝学的検討、あるいはその他の研究から、特定の疾患の原因遺伝子であることが明かとなっても、その遺伝子の生化学的機能を同定できないことが多く、また、仮に同定できたとしても、同定された機能が疾患発症の直接原因であるか否かを明らかにすることは更に困難である。例えば、パーキンソン病の同定された遺伝子の一つに α シヌクレイン (α -synuclein) という遺伝子がある (Polymeropoulos, M.H. et al., 1997, Science 276: 2045-2047)。この遺伝子産物に突然変異が生じるとパーキンソン病が発症することが確定的であるが、 α シヌクレインの生化学的な機能は今尚、不明である。あるいは、ATMという Ataxia telangiectasia (毛細血管拡張を伴う脊髄小脳変性症) の原因遺伝子は、PI3キナーゼ様活性をもつことが唯一の知られた生化学的機能であるが、この生化学的機能異常が該当疾患発症の原因であるか否かは全く不明である。このように、単に疾患原因遺伝子が同定されただけでは、これを基に疾患に対する治療分子を開発することは著しく困難である。

疾患抑制分子を得るために、より機能的な方法でスクリーニングを試みる系が開発されている。その1つは疾患原因遺伝子が惹起する細胞死を抑制する遺伝子や分子を探索するスクリーニング方法であり、これは従来、デストラップ法 (D'Adamio L et al., Semin. Immunol. 1997; 9:17-23) として知られている。しかしながら、単に従来のデストラップ法を用いるだけではスクリーニングの効率が著しく低く、有効な方法とはなり得なかった。

上述のように、ヒトに発生するほとんどすべての疾患は、疾患を惹起する異常遺伝子の作用 (もしくは疾患に関与する正常遺伝子の異常な作用) とその作用に拮抗する正常遺伝子または疾患抑制遺伝子との作用均衡の破綻に基づいて発症すると考えられるので、大部分の疾患について、これを抑制する遺伝子がゲノム上

に存在している可能性は高い。従って、デストラップ法を用いて、ヒト遺伝子ゲノムをカバーするcDNAライブラリーをスクリーニングすれば、理論的には疾患抑制遺伝子を発見できる可能性は存在する。しかしながら、実際にこれを行っても、広大なゲノムの中からそのような遺伝子を見出すことは極めて困難であり、実際、デストラップ法の確立後数年を経ても、この方法を用いて疾患抑制遺伝子は発見されていない。疾患抑制遺伝子をより効率的に検索できる方法が求められている。

発明の開示

本発明は、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドを効率的にスクリーニングする方法を提供することを課題とする。さらに本発明は、疾患抑制遺伝子およびポリペプチドの検査方法を提供することを課題とする。

上記課題を解決するため、本発明者は、細胞死を病態（の中心もしくは一部）とする疾患、すなわち細胞死を伴う疾患を対象に、この疾患の抑制遺伝子を効率的に検索する方法の開発を試みた。本発明者は、疾患抑制遺伝子をより効率的に検索するためには、検索の対象として単なるcDNAライブラリーではなく、疾患抑制候補遺伝子がより濃縮された集団を用いることが重要であると考えた。細胞死を伴う疾患においては、疾患の病態としての細胞死が起きている臓器、あるいは組織では、患部において細胞変性が生じる。通常、疾患状態にあるこのような臓器や組織は、疾患原因因子の探索の対象とはなっても、疾患抑制遺伝子を検索する対象とは考え難い。ここで本発明者は、細胞死を伴う疾患において、患部に含まれる細胞は必ずしも全てが細胞死を起しているわけではないことに注目した。また、患部周辺の比較的症状が軽度の組織や正常組織には、必ずしも疾患の原因が存在していないわけではなく、疾患原因が存在しているにも関わらず症状を発症しない可能性があると考えた。すなわち、正常組織が疾患を発症していないのは一見当然に見えるが、患部周辺の組織は疾患の発症を抑制する疾患抑制遺伝子を十分に発現しているために疾患を発症しないとも考えられるのである。このよ

うな考えに基づけば、疾患患部またはその周辺の組織からmRNAを調製し、これを基にcDNAライブラリーを作製すれば、疾患抑制遺伝子が濃縮されたライブラリーを構築できるはずである。

そこでこれを実証するため、本発明者は、細胞死を伴う疾患としてアルツハイマー病を例に、疾患抑制遺伝子のスクリーニングを試みた。アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は、効果的な治療法が確立されていない脳神経疾患の1つである。ADは、臨床的には進行性の記憶喪失および認知障害、病理学的には広範囲の神経喪失、神経細胞内集積物(intraneuronal tangles)、およびコンゴレッドに高親和性の核 (congophilic dense core) を持つ細胞外老人斑により特徴付けられる。早発性の家族性AD (FAD) を引き起こす遺伝子として、これまでに V642I/F/G APP (数字は 695アミノ酸を持つAPPである APP₆₉₅ に対応する)、K595N/M596L APP (NL-APP)、プレセニリン(PS)-1変異体、およびPS-2変異体が報告されている (Shastry, B.S. and GIBLIN, F.J. (1999) Brain Res. Bull. 48, 121-127)。これらの遺伝子の発現は、神経細胞株または初代培養神経等において細胞死を引き起こす(Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352; Zhao, B. et al. (1997) J. Neurosci. Res. 47, 253-263; Luo, J. J. et al. (1999) J. Neurosci. Res. 55, 629-42; Wolozin, B. et al. (1996) Science 274, 1710-1713; Wolozin, B. et al. (1998) Neurobiol. Aging 19, S23-27; Guo, Q. et al. (1996) Neuroreport 8, 379-83; Zhang, Z. et al. (1998) Nature 395, 698-702; Guo, Q. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96., 4125-30)。アルツハイマー病の臨床症状の多くは、進行性の神経細胞死により説明できることが一般に受け入れられており、ADにおける神経細胞死発症の病理機構を解明し、これを防ぐことは、これまでにない有効なAD治療法を確立するために必須の課題である。

本発明者はこれまでに、家族性アルツハイマー病型変異 V642I アミロイド前駆体蛋白質 (V642I APP) を誘導的に発現する神経細胞系 (F11/EcR/V642I) を確立している (国際公開番号 W000/14204参照)。この系では、V642I APPが F11神経細

胞においてエクダイソン処理に応答して発現する。F11/EcR/V642I 細胞をエクダイソンと2～3日インキュベートすることにより、ほぼ全ての細胞が細胞死を起こすが、V642I APPを発現させない対照のインキュベーションではごく少数の細胞が細胞死を起こすに過ぎない。本発明者は、このF11/EcR/V642I 細胞を、V642I APPにより誘導される神経細胞に対するアンタゴニストとして作用する遺伝子の検索に利用した。

まず、孤発性アルツハイマー病と診断された患者由来の後頭葉よりポリA⁺ RNAを調製した。大脳を神経細胞死の主座とするアルツハイマー病において、後頭葉は神経障害をほとんど受けない部位である。ポリA⁺ RNAをcDNAに逆転写した後、発現ベクターに組み込みライブラリーを構築した。これを上記 F11/EcR/V642I 細胞にトランスフェクションし、エクダイソンによりV642I APPの発現を誘導した。72時間後に神経細胞死から生き残った細胞からプラスミドを回収した。このデストラップ法によるスクリーニング操作を繰り返し行った結果、本発明者は、V642I APP による神経細胞死を保護する複数の遺伝子を同定することに成功した。

単離された遺伝子の1つである Humanin (HN) cDNAは、新規な24アミノ酸のポリペプチドをコードしており、ADに関連する神経細胞死、すなわち、既知の全てのタイプの早発型家族性AD遺伝子 [V642I APP、K595N/M596L APP、M146L プレセニリン(PS)-1、および N141I PS-2] およびA β 1-43により誘導される神経細胞死を抑制することが判明した。HN mRNA は中枢神経系およびそれ以外の幾つかの器官で産生されていた。HN cDNAを神経細胞にトランスフェクションしたところ、産生されたペプチドは培養液中に分泌されることが判明した。この培養上清には、V642I APPによる神経細胞死からの有意な保護を示すのに十分な活性が含まれていた。合成 HN ポリペプチドもまた、4種のAD遺伝子に対して同様の用量-応答特性で神経保護作用を示した。

このように、本発明者は、細胞死を伴う疾患に罹患した患者由来の試料をスクリーニングすることにより、該疾患に対する抑制遺伝子を得ることができること

を実証した。本発明者が実施したこの方法は、アルツハイマー病に限らず細胞死を病態の一部とする疾患すべてに適用できる。すなわち本発明により、細胞死を伴う様々な疾患に対する抑制遺伝子を高い効率でスクリーニングすることが可能となる。また細胞死を伴う疾患に罹患した患者由来のポリペプチドを含む試料を用いれば、疾患抑制遺伝子をスクリーニングする場合と同様に、疾患抑制ポリペプチドをスクリーニングすることも可能である。また、本発明者は、細胞死を伴う疾患に罹患した患者由来の核酸および該核酸がコードするポリペプチド、並びにその改変体を用いて、疾患に対する抑制効果の試験を行った。これと同様の検査は、細胞死を伴う他の疾患に罹患した患者由来の試料に対しても適用することができ、これにより該疾患に対する抑制効果を検査することができる。スクリーニングや検査により得られる遺伝子やポリペプチドは、疾患に対する治療に用いられる他、新たな医薬品開発の標的分子として利用され得る。本発明は細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸またはポリペプチドを検索することを特徴とする、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法、および疾患抑制遺伝子およびポリペプチドの検査方法に関し、より具体的には、

(1) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸またはポリペプチドを検索することを特徴とする、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法、

(2) 疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、

(b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、

(c) 該効果を有する核酸を選択する工程、を含む方法、

(3) 疾患抑制ポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞に投与する工程、

(b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、

(c) 該効果を有するポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸を選択する工程、を含む方法、

(4) 工程(a)あるいはその前または後において該疾患に関連する細胞死を誘導し、工程(b)において該細胞死の抑制を指標に該疾患に対する抑制効果を検出する、(2)または(3)に記載の方法、

(5) 疾患が脳神経系疾患である、(1)から(4)のいずれかに記載の方法、

(6) 脳神経系疾患がアルツハイマー病である、(5)に記載の方法、

(7) 核酸またはポリペプチドが神経または脳に由来する、(1)から(6)のいずれかに記載の方法、

(8) 疾患に対する抑制効果を検査する方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、

(b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む方法、

(9) 疾患に対する抑制効果を検査する方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞に投与する工程、

(b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む方法、

(10) 工程(a)あるいはその前または後において該疾患に関連する細胞死を

誘導し、工程（b）において該細胞死の抑制を指標に該疾患に対する抑制効果を検出する、（8）または（9）に記載の方法、

（11）疾患が脳神経系疾患である、（8）から（10）のいずれかに記載の方法

（12）脳神経系疾患がアルツハイマー病である、（11）に記載の方法、

（13）核酸またはポリペプチドが神経または脳に由来する、（8）から（12）のいずれかに記載の方法、に関する。

本発明は、細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸またはポリペプチドを検索することを特徴とする、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法を提供する。また、本発明は、該疾患に罹患した生物に由来する核酸またはポリペプチドを用いて、該疾患に対する抑制効果を検査する方法を提供する。細胞死を伴う限り、本発明のスクリーニング方法または検査方法が適用され得る疾患に特に制限はない。このような疾患には、アポトーシスおよび／またはネクローシスを惹起する疾患が含まれる。また、細胞変性を伴う疾患が含まれる。

「疾患に罹患した生物」には、疾患症状を発症した生物、および明白な症状を呈していなくとも、疾患の原因となる因子（もしくは要因）を有する生物が含まれる。例えば、疾患の原因遺伝子に変異を有していたり、発現に異常がある生物は、本発明において「疾患に罹患した生物」に含まれる。また、人為的に疾患状態を再現させたモデル動物なども含まれる。このようなモデル生物は、疾患原因となる因子を投与したり、疾患原因遺伝子の遺伝子操作などにより作製することができる。また本発明において「生物」は、個体および個体から分離された臓器や組織などの培養物が含まれる。これらの生物は遺伝的に改変されたものであってもよい。また、臓器や組織は他個体に移植されたものであってもよい。

本発明の方法を適用する対象となり得る疾患としては、細胞死を病態の中心、もしくは一部とするすべての疾患が挙げられる。具体的には、例えば神経疾患に

においては、すべての神経変性疾患、HIVを含むウィルスなどの外的因子による脳炎もしくは脳症、自己免疫機転のような内的因子による脳炎を含む。対象となる神経変性疾患は更に、2つに分類が可能である。一方が、特定の領域の神経細胞に変性が発生する疾患であり、他方が、広範囲の領域の神経細胞に変性が発生する疾患である。例えば、パーキンソン病は、大脳基底核黒質の神経細胞死によって疾患が引き起こされる為、前者に属する神経変性疾患である。この他、大脳基底核被殻および線条体に神経細胞死が発生するハンチントン病、網膜神経細胞に細胞死が発生する網膜色素変性症、脊髄神経細胞の細胞死が原因である筋萎縮性側索硬化症、小脳神経細胞に細胞死が発生する脊髄小脳変性症などが挙げられる。後者に属する神経変性疾患の例の代表はアルツハイマー病である。その他、び慢性レービー小体病、ピック病、あるいは前側頭葉痴呆症、更には、アルコール性脳症を含む。非神経疾患では、肺胞上皮細胞死が病態にある間質性肺炎、あるいは肺線維症、肝実質細胞死に起因する肝硬変症などがその代表であるが、その他に、腎硬化症、甲状腺機能低下症、動脈硬化症等も含まれる。

このように、本発明の方法は、細胞死を伴う疾患であればその適用対象は特に制限はないが、特に脳神経系疾患における抑制遺伝子または抑制ポリペプチドの検索ために好適に用いられる。脳神経系疾患とは、脳および／または神経系の障害を惹起する疾患を言う。代表的な脳神経系疾患としては、特に、上記のアルツハイマー病が挙げられる。これまでの研究からアルツハイマー病において神経細胞の細胞死が起こることが明らかにされている (I. Nishimoto et al., 1997, Adv. Pharmacol., 41: 337-368)。この細胞死には、APP (I. Nishimoto et al., 1998, Neurobiol. Aging., 19: S33-S38) やプレセニリン (Nishimura et al., 1999, Clin. Genet. 55: 219-225) のある種の活性化が関与していることが示唆されている。また、この細胞死には ApoE が関与していることも示唆されている (Namba, Y. et al., Brain Res. 541:163-166 (1991); Saunders, A.M. et al., Neurology 43:1467-1472 (1993); Corder, E.H. et al., Science 261:921-923 (1993); Ueki,

A. et al., *Neurosci. Lett.* 163:166-168 (1993); Sorbi, S. et al., *Ann. Neurol.* 38:124-127 (1995); Isoe, K. et al., *Acta Neurol. Scand.* 94: 326-328 (1996))。このため、本発明の方法は、アルツハイマー病に対する疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニングまたは検査に好適に用いられる。本発明の方法は、孤発性アルツハイマー病および家族性アルツハイマー病の両方に適用することが可能である。

またアルツハイマー病以外の脳神経系疾患としては、上記と重複するが、例えば脳虚血による神経細胞の細胞死に起因する疾患などの抑制遺伝子または抑制ポリペプチドをスクリーニングまたは検査することも可能である(T. Kirino, 1982, *Brain Res.*, 239: 57-69)。その他、痴呆を伴うパーキンソン病 (M.H. Polymeropoulos et al., 1997, *Science*, 276: 2045-2047)、びまん性レービー小体(Lewy bodies)病 (M.G. Spillantini et al., 1998, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 95: 6469-6473)、前頭葉痴呆(frontal dementia)等の他の神経変性疾患(Helisalmi, S. et al., *Neurosci. Lett.* 205:61-64 (1996)) や、血管性痴呆、虚血性脳血管障害に伴う痴呆、ある種のアルコール性痴呆 (Muramatsu, T. et al., *J. Neural. Transm.* 104:913-920 (1997))等の非AD型の痴呆(Helisalmi, S. et al., *Neurosci. Lett.* 205:61-64 (1996); Ji, Y. et al., *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9:243-245 (1998))、ダウン症に伴う痴呆や加齢に関連した記憶力の低下 (Blesa, R. et al., *Ann. Neurol.* 39:548-551 (1996)) などに対する抑制遺伝子や抑制ポリペプチドのスクリーニングまたは検査も、本発明の方法を用いて行うことができる。

細胞死を伴う疾患の患部またはその周辺では、疾患に対して感受性の高い組織や細胞は細胞死により脱落するため、疾患に対してより抵抗力の高い細胞が残される。このような疾患生物の患部またはその周辺の組織から試料を採取すれば、該疾患に対する抑制遺伝子または抑制ポリペプチドを高い効率で単離することができるのである。「患部またはその周辺」とは、疾患に関連する変化または疾患症

状を示す部位または周囲を言い、正常な細胞が含まれていてよい。例えば、疾患部位がある器官内に存在する場合、その器官全体は患部の周辺とすることができるであろう。脳疾患において、例えば前頭部に細胞変性が見られる場合、例えば後頭部を含む脳全体は「患部またはその周辺」に含まれる。

患部またはその周辺の組織を採取する対象となる臓器は特に制限されず、疾患の病態としての細胞死が起きている臓器、あるいは組織（例えば、神経疾患であれば、神経系、肺疾患であれば、肺組織など）を採取すればよい。この組織や細胞からcDNAライブラリーを作製すれば、そのライブラリーは病態組織の中で生き残った細胞で発現しているmRNAを濃縮するライブラリーとなる。また、この組織や細胞から、公知の蛋白質分離方法に従いポリペプチドを抽出することができる。

患部またはその周辺において疾患症状に差が見られる場合、試料はなるべく患部に近く、かつ疾患症状が軽度の組織または細胞から調製することが好ましい。また、患部とは無関係に、病変臓器に存在する正常、若しくは正常に近い部分から組織または細胞を採取して試料を調製することも好ましい。このような細胞は、疾患抑制遺伝子の発現レベルが他の細胞に比べ高い可能性があり、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニングを高い効率で行うことが期待できる。疾患症状が軽度とは、疾患に罹患した生物の中で、最も症状が重篤な部位と比べ、症状の程度が軽いことを指す。疾患に関連して複数の症状を呈する場合においては、少なくとも、そのいずれかの症状に関して比較される。例えば、疾患の病態としての細胞死が起きている臓器、あるいは組織の中で、効率的に細胞が生存する部位からRNAを抽出する。例えば、脳前頭皮質に重篤な症状が観察され、後頭皮質や小脳の症状が比較的軽い場合、後頭皮質または小脳頭から核酸試料を調製することができる。例えば、実施例においては、アルツハイマー病の抑制遺伝子をスクリーニングするために、ADにおける神経細胞死の主座である大脳の中でほとんど神経細胞が障害を受けない後頭葉からcDNAライブラリーが構築された。他の疾患においても、同様に疾患患部またはその周辺の細胞からRNAを抽出し

、cDNAライブラリーを構築することができる。

組織または細胞からの核酸またはポリペプチドの調製は、公知の方法に従って行うことができる (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)。本発明において「生物の細胞に由来するポリペプチド」には、細胞溶解物または抽出物、その分画物、粗精製または精製ポリペプチドなどが含まれる。細胞抽出物は、適当な分画法により適宜分画されていてよい。このような方法には、例えば硫酸沈殿、陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー、HPLC等の公知の蛋白質分画法または精製法が挙げられる。ポリペプチドは遊離していてもよく、また担体に結合していてもよい。なお、本発明においてポリペプチドとは2またはそれ以上のアミノ酸が結合したペプチドまたは蛋白質を指す。ポリペプチドは、通常、ペプチド、オリゴペプチド、またはオリゴマーなどと呼ばれるような短い鎖も含まれる。また、ポリペプチドは比較的短い鎖に限定されず、蛋白質と呼ばれるような長い鎖のものも含まれる。例えば300アミノ酸以上、500アミノ酸以上、あるいは1000アミノ酸以上の鎖長からなるポリペプチドであってもよい。すなわちポリペプチドは蛋白質を含む。

また、本発明において「生物の細胞に由来する核酸」には、生物から得た核酸および該核酸から合成した核酸、それらを含む核酸、およびその増幅産物が含まれる。核酸には、DNAおよびRNAが含まれる。例えば、生物から調製したDNA (例えば染色体DNAまたはオルガネラDNAなど)、その転写産物、生物から調製したRNA、該RNAから合成したcDNA、およびそれらの断片などが含まれる。また、生物に由来する核酸には、これらの核酸を含むベクター、該ベクターの増幅産物が含まれる。好ましくは、細胞から調製したmRNAを逆転写してcDNAを合成し、これを発現ベクターに挿入した発現cDNAライブラリーが構築される。RNAの逆転写によるcDNAの合成、およびcDNAからの発現ライブラリーの作製は、公知の方法に従って行うことができる (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor

Lab. press, 1989)。発現ライブラリーの構築に用いられるベクターとしては、例えばプラスミドベクター（例えば pcDNA および pEF-BOS など）およびウイルスベクター等が挙げられる。

このように調製した核酸またはポリペプチドを検索して、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニングを行う。核酸を検索するとは、核酸または該核酸を含む画分から、候補となる核酸またはそれを含む分画を同定または選別することを指す。また、ポリペプチドを検索するとは、ポリペプチド、または該ポリペプチドを含む画分から、候補となるポリペプチドまたはそれを含む分画を同定または選別することを指す。また、本発明によれば、これらの核酸またはポリペプチドを利用して、疾患に対する抑制効果を検査することも可能である。

組織からRNAを抽出する場合、RNAの分解を抑えるためにはできるだけ迅速に試料を回収し、核酸の調製を行う必要がある。本発明の方法は、疾患生物の患部またはその周辺の細胞から核酸の調製を行えば良く、組織染色や細胞選別などにより組織から特定の細胞を分離することは必須ではない。従って、疾患生物から即座に適切な組織を回収することが可能であり、核酸の分解を最小限に抑えることができる。

本発明のスクリーニングまたは検査方法に適用するために用いる核酸またはポリペプチドは、溶媒や溶質と組み合わせて組成物とすることができる。例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水、培地、血清、またはそれらを組み合わせた溶媒に、適宜溶解され得る。溶液には、塩や蛋白質、界面活性剤、保存剤等を溶解させることができる。また、核酸を細胞内の導入する場合には、LipofectAMINE (GIBCO BRL 社) 等の各種トランスフェクション試薬と組み合わせることができる。

本発明のスクリーニングは、細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸またはポリペプチドを用いることを特徴とする。患部またはその周辺の細胞で発現するRNAを調製することによって、疾患抑制遺伝子が濃縮されたライブラリーを構築することが期待できる。また同様に、患部また

はその周辺の細胞で発現するポリペプチドを調製することによって、疾患抑制ポリペプチドが濃縮されたライブラリーを構築することが期待できる。このようにして構築されたライブラリーは、疾患抑制遺伝子またはポリペプチドを検索するための機能的スクリーニングやその他の様々なスクリーニングに適用され得る。例えば、疾患原因遺伝子や蛋白質が知られている場合に、この発現や活性を正常に近づけるように作用する疾患抑制遺伝子またはポリペプチドを上記のライブラリーを用いて検索することが考えられる。例えば疾患原因蛋白質の生化学的機能の制御により治療効果が期待できる場合においては、本発明の方法を用いて、この生化学的機能を指標に疾患抑制遺伝子またはポリペプチドが濃縮されていると考えられるライブラリーの検索を行うことは有効である。これらのスクリーニングは、疾患の病態解析や疾患原因遺伝子の機能解析で用いられる公知の系を利用して行うことができる。罹患患部またはその周辺から調製した核酸は、適宜発現ベクター中に組み込み、細胞に導入してその作用が検出される。

また、本発明のスクリーニングは、例えば被検核酸または被検ポリペプチドの疾患に対する抑制効果を検出することにより実施することができる。このスクリーニングは、疾患原因遺伝子の生化学的活性などに注目するのではなく、疾患に対する抑制効果を指標に抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドをスクリーニングする方法である。このスクリーニング方法の1つは、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、

(b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、

(c) 該効果を有する核酸を選択する工程、を含む。

また、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞

に投与する工程、

(b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、

(c) 該効果を有するポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸を選択する工程、を含む方法によりスクリーニングを行うこともできる。

また、これと類似の工程により、被検ポリペプチド、被検核酸、または該核酸がコードするポリペプチドの疾患に対する抑制効果を検査することが可能である。この検査方法の1つは、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、

(b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む。

また、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞に投与する工程、

(b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む方法により検査を行うこともできる。このような方法により、例えばスクリーニングにより単離された核酸やポリペプチドをアッセイすることもできる。

疾患に対する抑制効果は、対象とする疾患の症状のいずれかを測定し、被検核酸の発現や被検ポリペプチドの投与により、この症状が抑制されるかを調べることにより行うことができる。疾患の症状は巨視的なものであっても微視的なものであってもよい。例えば微視的な症状として、疾患に関連して起こる細胞の表現形の変化や、疾患に伴う遺伝子（群）の発現レベルの変化などを指標とすることもできる。

上記のスクリーニングまたは検査で核酸を発現、またはポリペプチドを投与する宿主細胞としては特に制限はないが、例えば哺乳動物細胞を用いることができる。哺乳動物細胞としては特に制限はなく、マウス、ラット、ウサギ、サルなどの非ヒト哺乳動物細胞、およびヒト細胞を用いることができる。一般的な哺乳動物細胞株としては、CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞、HEK293細胞などが挙げられる。また、対象とする疾患の患部組織と同じ組織に由来する細胞株を用いることができる。脳神経系疾患の抑制遺伝子または抑制ポリペプチドのスクリーニングまたは検査には、好ましくは神経細胞が用いられる。神経細胞としては、例えば、神経系細胞、神経系細胞に由来する細胞および神経前駆細胞等が含まれる。また、神経芽細胞腫、褐色細胞腫、奇形腫、神経系細胞を用いた融合細胞および胎児性胚細胞等が含まれる。本発明の方法に用いられ得る神経細胞株としては、F11細胞(D. Platika ら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3499, T. Yamatsuji ら, 1996, Science, 272: 1349)、SH-SY5Y細胞(L. Odelstad et al., 1981, Brain Res., 224: 69-82)、PC12細胞(L.A. Greeneおよび A.S. Tischler, 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 2424-2428)、NTERA2細胞(J. Skowronskiおよび M. F. Singer, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6050-6054)、P19細胞、ならびにこれらに由来する細胞などが挙げられる。NTERA2細胞およびP19細胞においては、特に、レチノイン酸処理により神経分化を誘導したものが好ましい。F11細胞に由来する細胞としては、F11/EcR細胞(Y. Hashimoto et al., J. Biol. Chem. published on-line on August 3, 2000)、F11/EcR/V642I細胞(T. Niikura et al., 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun. 273: 442-447) (いずれも実施例参照) を挙げることができる。また、初代神経培養(例えばラット脳皮質初代培養)を用いることもできる。細胞での核酸の発現は、核酸を発現ベクターに組み込み、細胞に導入することにより行うことができる。またポリペプチドの投与は、培地に添加したり、細胞内に注入することにより行うことができる。また、細胞は個体内の細胞であってもよい。個体で核酸を発現させるには、発現ベクターを個体に投与すればよい。

発現ベクターとしては、例えばウイルスベクターが用いられる。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターなどの公知のベクター系が利用できる。ポリペプチドの投与は、組織または細胞への直接投与の他、静脈投与、経口投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与などの公知の投与経路により行うことができる。スクリーニングまたは検査に用いられる生物としては、マウス、ラット、ウサギ、サルなどの非ヒト哺乳動物が挙げられる。具体的には、*in vivo* または *in vitro* で構築される様々な疾患モデルを本発明の方法に適用することができる。このような疾患モデルは数多く知られている。

検出の結果、被検核酸の発現またはポリペプチドの投与が、疾患の発症、症状、および／または進行等に対して抑制的または正常に近づけるように作用する場合、疾患に対する抑制効果を有すると判定される。このように疾患に対する有意な抑制効果が認められる核酸またはポリペプチドは、それぞれ疾患に対し抑制効果を有する遺伝子またはポリペプチドと判定される。また検査においては、定量的な測定など、抑制効果のより詳細な測定を行うこともできる。

被検核酸またはポリペプチドの効果は直接的または間接的であり得る。例えば、核酸またはその発現産物自体（RNAまたはポリペプチド）が効果を有する場合や、核酸またはその発現産物が別の因子に作用することによって効果を発揮する場合が考えられる。上記のスクリーニング方法または検査方法により単離または選別され得るこれらの核酸は疾患抑制遺伝子となる。また、上記のスクリーニング方法または検査方法により単離または選別され得るポリペプチドは疾患抑制ポリペプチドとなる。単離されたポリペプチドは、例えば部分アミノ酸配列を解析し、これを基に作製したDNAプローブやプライマーによりゲノムDNAやcDNAをスクリーニングすることで、該ポリペプチドをコードする核酸（疾患抑制遺伝子）を取得することができる。

疾患に対する抑制効果を、細胞死により判別するスクリーニング系または検査系を構築することもできる。このスクリーニング方法または検査方法は、疾患の

病態の一部である細胞死そのものを指標とする方法である。このスクリーニングまたは検査方法は、上記工程（a）あるいはその前または後において該疾患に関連する細胞死を誘導し、工程（b）において該細胞死の抑制を指標に該疾患に対する抑制効果を検出する方法である。実施例において、本発明者はアルツハイマー病に関連する細胞死を誘導できる細胞系を利用して、該細胞死を抑制する遺伝子のスクリーニングを行った。この方法では、家族性アルツハイマー型変異APPを神経細胞で発現させ、誘導される細胞死を抑制する遺伝子がスクリーニングされる。神経細胞死の誘導は、実施例で用いられた V642I APPの発現に限定されず、細胞死を誘導する所望の処理により実施することができる（国際公開番号 W000/14204 および 国際出願番号 PCT/JP00/02830 参照）。また、スクリーニングにより単離されたポリペプチド、遺伝子、該遺伝子がコードするポリペプチド、およびそれらの誘導體などは、例えば実施例に記載したように、各種のFAD遺伝子やA β で誘導される神経細胞死に対する抑制効果について詳細な検査を行うことができる。

具体的な方法を例示すれば、例えば V642I/F/G APP、NL-APP、M146L PS-1、または N141I PS-2などのFAD遺伝子を発現するベクターを単独で、または検定したい核酸を発現するベクターと共に神経細胞（例えばF11細胞）にトランスフェクトする。あるいは、初代神経培養（例えばラット脳皮質初代培養）へのA β （例えばA β 1-43）の添加により細胞死を誘導してもよい。また、APPリガンド（APP抗体を含む）の添加、ApoE4などの ApoER-1リガンドの添加などによって細胞死を誘導することもできる。被検核酸を発現させて培養後、細胞死を測定する。FAD遺伝子は、誘導性プロモーターを用いてコンディショナルに発現させることもできる。検定したい核酸の非発現条件で誘導される細胞死に対して、該核酸を発現させた条件下における細胞死の比率が有意に低下すれば、この核酸は疾患に対して抑制効果を有する遺伝子であると判定される。被検試料としてポリペプチドを用いる場合は、このポリペプチドを含む試料の存在下または非存在下で細胞死を測定する。

検定したいポリペプチドの非存在下で誘導される細胞死に対して、該ポリペプチドの存在下における細胞死の比率が有意に低下すれば、このポリペプチドは疾患に対して抑制効果を有するポリペプチドであると判定される。核酸の作用の検査やスクリーニングにおいては、被検核酸を発現させる代わりに、検定したい核酸がコードし得るポリペプチドを予め調製しておき、このポリペプチドの存在下または非存在下で細胞死を測定してもよい。

細胞死の抑制を指標とするスクリーニングや検出は、アルツハイマー病以外の疾患に対しても同様に適用することができる。疾患に関連する細胞死は、例えば疾患を再現する因子を与えたり、疾患原因遺伝子を発現させたりすることにより誘導し得る。具体的には、例えば、ポリグルタミンを神経細胞に発現して細胞死を誘導する系 (de Cristofaro, T. et al., 2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 816-821) を利用することができる。この系は、脊髄小脳変性症やハンチントン病のモデルとして知られ、本発明において、これらの疾患に対する抑制遺伝子や抑制ポリペプチドの検査やスクリーニングに適用され得る。また、SOD1変異体を発現する系 (Silani, V. et al., 2000, *J. Neurol.* 247 Suppl 1: I28-36) も挙げることができる。この系は、筋萎縮性側索硬化症のモデルとして知られており、この疾患の抑制遺伝子や抑制ポリペプチドの検索も本発明の方法の適用対象となる。また、プリオン部分ペプチド (116-126) を神経細胞に処理する系 (Thellung, S. et al., 2000, *Int. J. Dev. Neurosci.* 18: 481-492) はプリオンによる脳症のモデルとして本発明において利用できる。また、ヒトアミリンを膵 β 細胞に処理する系 (Bai, J.Z. et al., 1999, *Biochem. J.* 343 Pt 1: 53-61) はI型糖尿病のモデルとして利用することができる。さらに、Jurkat細胞などのT細胞に抗Fas抗体を処理する系 (Li, X.K. et al., 2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 101-109) は劇症肝炎のモデルとして、同じくT細胞にT細胞受容体抗体を処理する系 (Vito, P. et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 31025-31028) は自己免疫疾患の系として利用され得る。また、ロドプシン変異体を発現する

系 (Liu, C. et al., 1999, J. Neurosci. 19: 4778-85) は網膜色素変性症のモデルとして本発明の方法の適用対象となる。これらのモデルにおいて、例えば疾患生物の患部またはその周辺に由来する核酸やポリペプチドを導入し、細胞死の比率を検出することにより本発明の検出またはスクリーニングを行うことができる。核酸またはポリペプチド試料の由来に制限はないが、例えば患者組織に由来するもの、または疾患モデル動物に由来するものなどが挙げられる。また、モデル培養系等に由来するものであってもよい。

実施例において、本発明者は72回の繰り返しを持つポリグルタミン Q79 による神経細胞死誘導系を用いて、HNペプチドの効果を検討している (実施例 8)。上記のように、ポリグルタミン Q79 は、ハンチントン病 (HD) や、ある種の脊髄小脳性運動失調症 (spinocerebellar ataxia; SCA) の原因になっていると考えられている (Ikeda, H. et al. (1996) Nat. Genet. 13, 196-202; Kakizuka, A. (1997) Curr. Opin. Neurol. 10, 285-90)。本発明者は、具体的には、エクダイソンにより発現が誘導される Q79 プラスミド (pDN-E/G5H-Q79) を F11/EcR 細胞にトランスフェクトし、エクダイソンの存在下または非存在下で神経細胞死を誘導し、HNポリペプチドの抑制効果を検査した。これと同じ系は、ハンチントン病 (HD) や、脊髄小脳性運動失調症 (SCA) の抑制遺伝子または抑制ポリペプチドのスクリーニングや検査に用いることができる。すなわち、罹患患部またはその周辺から調製した mRNA から構築した発現ライブラリーを上記の細胞にトランスフェクトし、細胞死を検出することにより実施することができる。

また、本発明者は、家族性筋萎縮性側索硬化症 (familial amyotrophic lateral sclerosis; 家族性 ALS) に関連した Cu/Zn 依存性スーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) の変異体による神経細胞死を誘導する系を用いて HNペプチドの効果を検討している (実施例 8)。この実験では、SOD1 の A4T、G85R、または G93A 変異体により細胞死を誘導した。これと同様の系を本発明の方法に適用すれば、ALS の抑制遺伝子または抑制ポリペプチドの検査およびスクリーニングを行うことが

可能である。同様に、その他の疾患モデル系を用いて、本発明のスクリーニングおよび検査を実施することが可能である。

細胞死の検出方法としては、細胞数測定、トリパンプルー排除法などによる生細胞測定、MTTなどを用いた生化学的アッセイ等が挙げられる。またLDH放出を測定してもよい。更に、アポトーシスを検出する方法を用いることもできる。アポトーシス検出法としては、TUNEL法、DNAラダー法、電子顕微鏡を用いた方法、あるいは核や細胞膜の特有の変化を検出する方法が挙げられる。最後者の例としては、アネキシンV測定法や、核の形態変化、またはカスパーゼ活性を測定する方法が挙げられる。

検出の結果、細胞死の比率を有意に低下させる効果が認められれば、スクリーニングまたは検査に用いた被検核酸またはポリペプチドは疾患に対し抑制効果を有する遺伝子またはポリペプチドと判定される。このとき、細胞死を完全には阻害できなくても、被検核酸を発現させない場合または被検ポリペプチド非存在下における場合に比べ、細胞死の比率を有意に低下させるものであればよい。このようにして疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドを単離または選別することができる。

上記に記載した本発明の方法により単離または選別された遺伝子やポリペプチドは、疾患の予防や治療のための利用が期待される。疾患抑制遺伝子はベクターに挿入して増幅や発現を行うことができる。このようなベクターは、遺伝子治療目的に利用することも可能である。遺伝子治療に用いるためのベクター系としては、アデノウイルスベクター、AAV（アデノ随伴ウイルス）ベクター、ヘルペスウイルスベクター（いずれも Robbins and Ghivizzani, Pharmacol. Ther. 80: 35-47, 1998）、レトロウイルスベクター（Engel and Kohn, Front. Biosci. 4: e26-33, 1999）、レンチウイルスベクター（Lundstrom, K., 1999, J. Recept. Signal. Transduct. Res. 19: 673-686）などを用いることが考えられるが、これらに制限されない。また、効果が維持される限り、遺伝子の塩基配列およびポリペプチドのアミノ酸

配列は、欠失、付加、挿入、および/または置換などにより適宜変異を加えることができる。

単離された遺伝子がペプチドをコードする場合は、遺伝子を発現させることによりペプチドを産生させることができる。ポリペプチドの産生のために用いられる宿主に特に制限はなく、大腸菌、酵母、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などの細胞または個体を用いることができる。宿主-ベクター系としては、例えば、バキュロウイルス-Sf細胞系 (Okamoto et al., J. Biol. Chem. 270: 4205-4208, 1995)、pcDNA-CHO細胞系 (Takahashi et al., J. Biol. Chem. 270: 19041-19045, 1995)、および CMVプロモータープラスミド-COS細胞系 (Yamatsuji et al., EMBO J. 15: 498-509, 1996) などが挙げられるが、これらに制限されない。

また、上記の核酸またはポリペプチドは、人工的に合成したり、誘導体とすることが可能である。「誘導体」とは、核酸またはポリペプチドの官能基を修飾、付加、変異、置換、または削除などにより改変された形態を持つ分子である。このような改変は既知の方法により行うことができる。官能基の改変は、例えば、核酸またはポリペプチドに存在する官能基の保護、安定性または組織移行性の制御、あるいは疾患を抑制する活性の制御等を目的として行われうる。

単離された核酸またはポリペプチド、あるいは該核酸によりコードされるポリペプチドは、疾患を抑制するための試薬とすることができる。核酸は適宜ベクターに組み込み、該ベクターを試薬とすることができる。核酸またはポリペプチドを含む試薬は、核酸やポリペプチド自体を試薬として用いる他、滅菌水、生理食塩水、緩衝剤、塩、安定剤、保存剤、界面活性剤、他の蛋白質 (BSAなど)、トランスフェクション試薬 (リポフェクション試薬を含む) 等と適宜組み合わせてもよい。これらは混ぜ合わさっていてもよく、使用時に混合されるまで分離されていてもよい。

また、上記核酸 (若しくはベクター) またはポリペプチドは、疾患に対する医薬組成物とすることができる。この医薬組成物は、核酸またはポリペプチド自体

を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化することも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、徐放剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。医薬組成物は、水溶液、錠剤、カプセル、トローチ、バッカル錠、エリキシル、懸濁液、シロップ、点鼻液、または吸入液などの形態であり得る。核酸やポリペプチドの含有率は適宜決定すればよい。

患者への投与は、有効成分の性質に応じて、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、脊髄腔内、脳室内、または経口的に行われうるがそれらに限定されない。脳神経系疾患の治療に用いる場合においては、上記医薬組成物は、静脈内、脊髄腔内、脳室内または硬膜内注射を含む任意の適当な経路で中枢神経系に導入するのが望ましい。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。投与量、投与方法は、医薬組成物の有効成分の組織移行性、治療目的、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、Humanin cDNA クローンにおける、V642I APPによる細胞死をアンタゴナイズする活性をコードする領域を示す図である。

DNA断片を、最も長い配列（-934から600；1番目の塩基は Humanin ORF の最初の塩基に対応し、その1塩基前は -1 である）に対して整列させた。V642I APP により誘導される F11/EcR 細胞の細胞死に対するそれらの活性を横に示す。F11/EcR 細胞に V642I APP をコードする pIND (1 μ g) と共に、1 μ gの pEF-BOS またはそれぞれのDNA断片をコードする pEF-BOS を3時間トランスフェクトし、続いてエクダイソンで72時間処理した。トリパンブルー排除アッセイにより細胞死

を測定した。pEF-BOS をトランスフェクトした細胞とそれぞれのDNA断片をトランスフェクトした細胞との間で、細胞死に統計的に有意な差があった場合、このDNA断片にはアンタゴナイズ活性があると判定し、“Y”で示した。“N”は有意なアンタゴナイズ活性がなかったことを示す。

図2は、エクダイソンにより誘導される V642I APP の発現による神経細胞死における DT63 と DT171 クローンの効果を示す図である。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 V642I APP プラスミドと共に、pEF-BOS、DT63、またはDT171 (DT63 とDT171は pEF-BOS にクローン化されている)をトランスフェクトし、Ponasterone (エクダイソン) 処理を行った。エクダイソン処理を行わない群も設定した。エクダイソン処理の 72 時間後、トリパンプルー排除アッセイにより細胞死を測定した。また、エクダイソン処理を行わない群も同様に測定した。図中のエラーバーのある数値は、3回の独立したトランスフェクションの結果の平均±S.D.を表す。DT63とDT171は図1に示されている。

図3は、FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における DT63 クローンの効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (vec) または DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンプルー排除アッセイにより測定した。図中のエラーバーのある数値は、3回の独立したトランスフェクションの結果の平均±S.D.を表す。

図4は、FAD遺伝子のトランスフェクションによる F11 細胞の細胞死における DT29、DT44、および DT171 クローンの効果を示す図である。図3と同様に、F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (pBOS) または DT クローンをコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンプルー排除アッセイにより測定した。DT29とDT44は図1に示されている。3つの実験を同時に行ったところ、ベーサルな細胞死の比率(トランスフェクションなし、pcDNA+pBOS

）は共通していた。同様の実験は少なくとも3回行った。図中のエラーバーのある数値は平均±S.D.を表す。

図5は、FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における、Humaninをコードするプラスミド pHN の効果を示す図である。F11細胞に空ベクター (pcDNA) または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pFLAG または HN をコードする pFLAG (pHN) をトランスフェクトし 72 時間培養した。細胞死をトリパンプルー排除アッセイにより測定した。値は3回の独立した実験結果の平均±S.D.を表す。

図6は、V642I APPにより誘導される神経細胞死における、pHN をトランスフェクトしたF11細胞からの培養上清の抑制効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APPをコードする pcDNA を血清非存在下で3時間トランスフェクトし、18%FBSを含む HamF-12 で2時間培養した後、CM/F11-pHN (CM/pHN)、CN/F11-vec (CM/vec)、または新鮮な培地 (18%FBSを含む新しい HamF-12) で67時間培養した。トランスフェクション 72時間後に、トリパンプルー排除アッセイにより細胞死を測定した。値は3回の独立した実験結果の平均±S.D.を表す。 $p<0.01$ は Student の t 検定による。

図7は、pHNをトランスフェクトしたF11細胞の培養上清に含まれる HN ポリペプチドの免疫反応性を示す写真である。左と中央のパネルは、細胞抽出液 (30 μ g protein) および培養上清 (20 μ l) をTris/Tricineゲル電気泳動後、抗FLAG抗体を用いたイムノプロットを行った結果を示す (1: トランスフェクションなしの細胞; 2: pFLAGをトランスフェクトした細胞; 3: pHNをトランスフェクトした細胞)。右のパネルは、pHN、pHNG、またはpHNA をトランスフェクトした細胞の培養上清を同様に解析した結果である。右の3レーンは、培養上清中に含まれる HN ポリペプチドのタイターを決定するために、図示した濃度の sHN-FLAG (MAPRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRAGTDYKDDDDK: 下線は FLAGタグ) (配列番号: 6) のイムノプロットを行った結果を示す。同様の実験は4回以上繰り返した。

図 8 は、V642I APPにより誘導される神経細胞死における、合成HN (sHN) およびその構造的誘導体の効果を示す図である。F11細胞に V642I APPをコードする pcDNA をトランスフェクトし、様々な濃度の sHN (元々の HN) (配列番号：5)、sHNG (S14G) (配列番号：7)、sHNA (C8A) (配列番号：8)、C8を介した sHN のダイマー型 (C8-C8)、および C末の KRRA を AAAA に置換した sHN (KRRA21/22/23/24AAAA) (配列番号：9) で処理した。トランスフェクション 72 時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図 9 は、M146L PS-1、N141I PS-2、または NL-APP により誘導される神経細胞死における sHN、sHNG、または sHNAの効果を示す図である。図 8 と同様に、M146L PS-1、N141I PS-2、または NL-APP cDNA をトランスフェクトした F11 細胞を、様々な濃度の sHN (元々の HN)、sHNG (S14G)、または sHNA (C8A) で処理した。トランスフェクション 72時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図 10 は、ポリグルタミンリピート Q79 により誘導される神経細胞死における HNおよびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。図は全て 3 回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

A: エクダイソンで誘導される Q79 の発現により引き起こされる神経細胞死における、pHN、pHNG、または pHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 Q79 発現プラスミドと共に、空ベクター (pFLAG)、または pHN、pHNG、もしくは pHNAをトランスフェクトし、エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: エクダイソンで誘導される NL-APP、V642I APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 の発現により引き起こされる神経細胞死における、pHNのコトランスフェクションによる有意な抑制効果。A と同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型FAD遺伝子プラスミドと共に、pFLAG または pHN をトランスフェクトし、

エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

C: エクダイソンで誘導される Q79 の発現により引き起こされる神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 Q79 プラスミドをトランスフェクトし、1 μ M の sHN、sHNG、または sHNA で処理し、その後エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で培養した。エクダイソン処理開始の72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

D: エクダイソンで誘導される NL-APP、V642I APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 の発現により引き起こされる神経細胞死における、sHNの有意な抑制効果。Cと同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型FAD遺伝子プラスミドをトランスフェクトし、1 μ MのsHNで処理した後、エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で培養した。エクダイソン処理開始の72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

図 1 1 は、ALS関連SOD1変異体により誘導される神経細胞死におけるHNおよびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。図は全て 3 回の独立した実験の平均 \pm S.D.を示す。

A: ALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、pHNのコトランスフェクションの効果の欠如。F11 細胞に、ALS関連変異 SOD1 (SOD1 の A4T、G85R、またはG93A 変異体) をコードする pEF-BOSを、空ベクター (pFLAG)、または pHN と共にトランスフェクトした。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: ALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11 細胞に、A4T、G85R、またはG93A SOD1 をコードする pEF-BOSをトランスフェクトし、100 μ M の sHN、sHNG、または sHNA で処理した。その後、細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

図12は、 $A\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死における HN の効果を示す位相差顕微鏡像を示す写真である。代表的な観察像を示した。初代培養皮質神経を、sHN (10nM, 10 μ M)、10nM sHNG、または 10 μ M sHNA の存在下または非存在下で 25 μ M の $A\beta$ 1-43 で 72 時間処理した。 $A\beta$ 1-43処理の開始16時間前に、図示した最終濃度のHNポリペプチドを1回添加した。 $A\beta$ 1-43の添加は、まず培地の半分を除去し、上記と同じ濃度のsHNまたはsHNAと50 μ Mの $A\beta$ 1-43とを含む新鮮な培地を除去した培地と等量補充することによって行った。 $A\beta$ 処理しない未処理の細胞 (no treatment) も観察した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。

図13は、 $A\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死における HN の効果を示す図である。初代培養皮質神経を、図示した濃度の sHN、sHNG、または sHNA の存在下または非存在下で 25 μ M の $A\beta$ 1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図12と同様に行った。 $A\beta$ 処理の開始から72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。これらの実験の際、ポジティブコントロールとして、初代培養神経を 10 μ M sHN または HN誘導体の存在下または非存在下、20 μ Mのエトポサイドで72時間同様に処理した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均 \pm S.D.を示す。

図14は、 $A\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死における HN の効果を示す図である。培養液中に放出されたLDH量により細胞傷害性をモニターした。初代培養皮質神経を、図示した濃度の sHN、sHNG、または sHNA の存在下または非存在下で 25 μ M の $A\beta$ 1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図12と同様に行った。 $A\beta$ 処理開始の24、48、または72時間後に培養液中のLDH量を測定した。HNポリペプチドの存在下または非存在下で20 μ Mのエトポサイドで処理した神経からのLDH放出も測定した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均 \pm S.D.を示す。

図15は、 $A\beta$ 1-43 により誘導される初代培養神経の細胞死における HN の効

果を示す写真である。Calcein-AM染色の結果を蛍光顕微鏡像で示す。初代培養皮質神経を、図示した最終濃度の HNポリペプチドの存在下または非存在下で $25\mu\text{M}$ の $\text{A}\beta 1-43$ を添加した。HNポリペプチドの添加は図 1 2 と同様に行った。 $\text{A}\beta 1-43$ 処理の 72 時間後に Calcein-AM で染色を行った。 $\text{A}\beta$ 処理しない未処理の細胞 (no treatment) も観察した。細胞質における蛍光は生細胞であることを表す。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は代表的な結果を示す。

図 1 6 は、Calcein-AM染色の蛍光測定の結果を示す図である。初代培養皮質神経を、図示した最終濃度の HNポリペプチドの存在下または非存在下で $25\mu\text{M}$ の $\text{A}\beta 1-43$ を添加した。HNポリペプチドの添加は図 1 2 と同様に行った。 $\text{A}\beta 1-43$ 処理の 72 時間後に Calcein-AM で染色を行い、蛍光強度を測定した。基底状態の蛍光強度は 36960 (unit/well) と計算され、これを各値から差し引いた。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均 \pm S.D.を示す。

図 1 7 は、ヒトの様々な組織中での HN mRNA の発現を示す写真である。ヒト組織のポリA-RNAがプロットされたシートに放射標識したアンチセンスHN (a)、5' 領域をコードする19mer (b)、またはDT77 (c) をプローブとしてハイブリダイズさせた (1:脳、2:心臓、3:骨格筋、4:大腸、5:胸腺、6:脾臓、7:腎臓、8:肝臓、9:小腸、10:膵臓、11:肺、12:末梢血白血球)。(d) は同じシートを、 β -actin をプローブにしてノーザンプロットを行った結果を示す。左側の数字は分子量サイズを示す。同様の実験は少なくとも3回行い、これと同様の結果を得た。

図 1 8 は、マウス組織での HN mRNA の発現を示す写真である。マウスの様々な器官から抽出したポリA-RNA ($2\mu\text{g}$ /レーン) を1.2%アガロースゲルで電気泳動し、プロット後、標識したアンチセンスHN (左上) または β -actin (左下) をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った (1:脳、2:心臓、3:骨格筋、4:胸腺、5:脾臓、6:腎臓、7:肝臓、8:小腸、9:胃、10:皮膚、11:肺)。

右のパネルはマウス脳におけるHN mRNAの発現領域を示す図である。マウス脳の様々な領域由来のポリA-RNAがプロットされたシート（1:前頭葉、2:側頭葉、3:頭頂葉、4:後頭葉、5:小脳、6:肺）に、標識したアンチセンスHN（右上）または β -actin（右下）プローブをハイブリダイズさせた。シート間で量的な比較ができるように、左パネルと同じ量の肺由来のポリA-RNAをレーン6に泳動してハイブリダイゼーションを行った。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら制限されるものではない。本実施例に記載された実験方法を以下に示す。

V642I APP cDNA は以前記載されている (Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352)。PS-1 cDNA の M146L変異体および PS-2 cDNA の N141I 変異体は、それぞれ Peter St. George-Hyslop博士 (Sherrington, R. et al. (1995) Nature 375, 754-760)、および Luciano D'Adamo博士 (Wolozin, B. et al. (1996) Science 274, 1710-1713) より寄贈された。本実施例で用いた全てのFAD遺伝子は pcDNA ベクター (Funk, C.D. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5638-5642) にコードされている。SOD1 cDNA の ALS関連変異体 (A4T、G85R、G93A) (Takahashi, H. et al. (1994) Acta Neuropathol. 88, 185-8)、および pDN-E/G5H-Q79 は、それぞれ Shoji Tsuji博士 (Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan)、および Akira Kakizuka博士 (Osaka Biomedical Research Center, Osaka, Japan) より寄贈された。

Humanin をコードするプラスミド pHN は、HN cDNA を pFLAG-CMV-5aベクター (pFLAG) (Eastman Kodak) のポリクローニングサイトに挿入して構築した。すなわち、pFLAG-CMV-5aプラスミドを EcoRI および KpnI で切断し、HNをコードするセンスオリゴヌクレオチド (5'-AATTCACCATGGCTCCACGAGGGTTCAGCTGTCTCTTACTTTT

AACCAGTGAAATTGACCTGCCCCGTGAAGAGGCGGGCAGGTAC-3' / 配列番号: 1) とアンチオリゴヌクレオチド (5' -CTGCCCCGCTCTTCACGGGCAGGTCAATTTCACTGGTTAAAAGTAAGAGACAGCTGAACCCCTCGTGGAGCCATGGTG-3' / 配列番号: 2) をライゲーションした。このプラスミドは、FLAGタグ (DYKDDDDK) がC末端に融合したHumaninポリペプチドを発現する。

変異HNをコードする pFLAGプラスミド (pHNGおよびpHNA) は、pHNから Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて構築した。配列は、直接塩基配列決定法により確認した。合成 HN ポリペプチド (sHN) および構造改変した合成ポリペプチドは95%以上に精製したものをを用いた。

合成HN (sHN) および他の幾つかの合成HN誘導ポリペプチドは2箇所の入手経路から独立して入手したが、どちらも本質的に同じ結果が得られた。抗FLAG抗体はEastman Kodak (M2モノクローナル抗体, Cat. #IB13010) から購入した。A β 1-43はBACHEM (Cat. #H-1586) より購入した。他の試薬は全て商業的に入手可能なものをを用いた。

F11細胞 (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503; Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352) は、18%ウシ胎児血清(FBS)および抗生物質を含む HamF-12 培地で培養した。6ウェルプレート上に 7×10^4 /ウェルのF11細胞を播き、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養した後、FAD遺伝子をコードするプラスミドを、HNをコードするプラスミド (pHN等) と共に、リポフェクションにより血清の非存在下3時間トランスフェクトし (FAD cDNA 発現プラスミド 1 μ g、HN cDNA 発現プラスミド 1 μ g、LipofectAMINE 4 μ l、Plus試薬 8 μ l)、18% FBSを含む HamF-12 培地で2時間培養した。その後培地を 10% FBSを含む HamF-12 培地に交換し、さらに67時間培養した。トランスフェクションから72時間後、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。合成 HN ポリペプチドを用いた実験では、F11細胞 (6 ウェルプレート上で 7×10^4 /ウェル) に血清非存在下で上記と同様に FAD遺伝子を3時

間トランスフェクトし、18% FBSを含む HamF-12 培地で2時間培養した後、様々な濃度の HN ポリペプチドと共に 10% FBSを含む HamF-12 培地で 67時間培養し、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。SOD1のALS関連変異体 cDNA も同様にトランスフェクトし、その神経毒性の試験を行った。

pHNをトランスフェクトした F11細胞の培養上清 (CM/F11-pHN) を得るためには、F11細胞に pHN をリポフェクションにて血清非存在下で3時間トランスフェクトし (pHN 1 μ g、LipofectAMINE 2 μ l、Plus試薬 4 μ l)、18% FBSを含む HamF-12 培地で2時間培養した。その後培地を 10% FBSを含む HamF-12 培地に交換し、さらに67時間培養した。この培養培地を1回凍結融解して CM/F11-pHN とした。CM/F11-vecは、pFLAGをトランスフェクトしたF11細胞から同様にして調製した。CM/F11-pHN、CM/F11-pHNG、および CM/F11-pHNA のイムノブロット解析では、凍結融解しない培養培地にプロテアーゼインヒビターカクテル (Boehringer Mannheim, Cat. #1697498; 2mlの蒸留水に1錠を溶かし、試料の 1/25 容を添加した) を加えた。細胞のライセートを用いたイムノブロット解析では、細胞をPBSで2回洗浄し、30 μ lのホモジェナイジングバッファー [10mM Tris/HCl (pH7.5), 1mM EDTA, 1% Triton X-100, および 1錠/50mlのプロテアーゼインヒビターカクテル] 中に懸濁した。2回凍結融解した後、細胞のホモジェネートを4°Cで 15,000rpmで10分遠心し、上清をTris/Tricineゲル電気泳動してイムノブロット解析に供した。Tris/Tricineゲル電気泳動は、以前記載されたように行った (Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Analytical Biochemistry 166, 168-179)。

F11/EcR/V642I 細胞は、エクダイソン誘導型 V642I APP 発現プラスミドを用いて樹立した。まず、共発現ベクター pVgRXR (Invitrogen) を F11細胞に導入し、それに続くZeocin選択により、エクダイソン受容体 EcR とレチノイドX受容体 RXR の両方を安定に過剰発現する F11細胞 (F11/EcR細胞) を樹立した。多コピーのエクダイソン応答配列を有する pIND ベクター (Invitrogen) に V642I APP cDNA

を挿入し、F11/EcR細胞にトランスフェクトした後、G418選択を行った。限界希釈により、F11/EcR/V642I 細胞をクローニングした。F11/EcR/V642I 細胞は、18% FBS と抗生物質を含む HamF-12 培地で培養した。エクダイソン処理の前に、細胞を 10% FBS 存在下で 24 時間培養した。その後、10% FBS 存在下で細胞培養液にエクダイソン (40 μ M Ponasterone; Invitrogen Cat. #H101-01) を添加した。エクダイソン処理に応答して、各F11/EcR/V642I 細胞で細胞死が起こり、全細胞中の細胞死の比率は処理後 72 時間で 60~70%、処理後 96 時間で80~90%に達した。F11/EcR/V642I 細胞の更に詳細な解析は、別途記載されている (国際公開番号 W000/14204参照)。

エクダイソンを用いた F11/EcR細胞の実験では、F11/EcR細胞を 6 ウェルプレートに 7×10^4 /ウェルで播き、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養し、エクダイソン誘導型プラスミド 1 μ gを単独で、または HNをコードするプラスミド 1 μ g と共に、血清非存在下で上記と同様に 3 時間トランスフェクトした。18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養した後、細胞を10% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養し、エクダイソン (Ponasterone) を培地に添加した (終濃度 40 μ M)。エクダイソンで処理後72時間での細胞死を測定した。合成 HN ポリペプチドを用いた実験では、細胞に FAD遺伝子を血清非存在下で 3 時間同様にトランスフェクトし、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養し、様々な濃度の HN ポリペプチドと 10% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養し、40 μ M の Ponasterone を培地に添加した。エクダイソンで処理後72時間での細胞死を、トリパンブルー排除アッセイにより測定した。HD/SCA関連 Q79 cDNA も同様にトランスフェクトし、その神経毒性の試験を行った。

マウス皮質神経の初代培養は、ポリ-D-リジンコートした 24ウェルプレート (Sumitomo Bakelite) を用い、血清非存在下およびN2サプリメントの存在下で、以前記載されたように行った (Eksioglu, Y. Z. et al. (1994) Brain Res. 644, 282-90)。この方法により調製した神経の純度は>98%であった。調製した神経 (

1.25×10⁵/ウェル, 250μl培地/ウェル) は、10nMまたは10μMの sHN ポリペプチド存在下または非存在下で 16 時間ブレインキュベートを行い、同じ濃度の sHNポリペプチドの存在下または非存在下で、25μMの Aβ1-43 で 24~72 時間処理を行った。初代培養神経は、培地交換に伴う一過的な乾燥でも傷害を受けるため、Aβ1-43 による細胞の処理は次のように行った。まず、古い培地の半量 (125 μl) を捨てた。そして、50μM の Aβ1-43 と先に示した濃度の sHN を含む予め温めておいた新鮮な培地 125μlを培養に加えた。

トリパンブルー排除アッセイは、次のようにして行った。プレウォッシュなしで細胞を血清不含の培地に穏やかにピペッティングして懸濁した。200μlの細胞懸濁液に 50μlの 0.4%トリパンブルー溶液 (Sigma, Cat. #T-8154) を加え (終濃度 0.08%)、室温で混合した。トリパンブルー溶液を加えてから3分以内に、染色された細胞を計数した。これを基に細胞死の比率を決定した [100-細胞生存率 (%)]。LDHアッセイは、神経を培養した培地 6μlをサンプリングして、キット (LDH-Cytotoxic Test; Wako Pure Chemical Industries, Cat. #299-50601) を用いて行った。カルセイン染色は、以前記載されたようにして行った (Bozyczko-Coyne, D. et al. (1993) Journal of Neuroscience Methods 50, 205-216)。簡単には、6 μM の Calcein-AM {3',6'-Di-(O-acetyl)-2',7'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester; Dojindo, Cat. #349-07201} を神経に添加し、Calcein-AM 処理後 30 分以上経過してから蛍光 (ex=490nm, em=515nm) を蛍光顕微鏡により観察し、スペクトロメーターにより測定した。特異的な蛍光は、全蛍光から基底状態の蛍光を差し引いて計算した。基底状態の蛍光は、トリパンブルー陽性度-蛍光強度の直線関係から算出される、100%トリパンブルー陽性に対応する値とした。

アッセイは少なくとも3回、独立してトランスフェクションまたは処理を繰り返して行った。統計解析では Student の t 検定を行った。

ノーザンブロット解析のためのオリゴヌクレオチドの放射標識は、Renaissance

3' end labeling system (NEN) を用いてターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) により行った。すなわち、75pmolのプローブオリゴヌクレオチド、100pmolの 3'-[³²P]-dATP (185TBq/mmol, NEN)、および 36 unit のTdTを37°Cで30分インキュベートした後、標識されたオリゴヌクレオチドをゲル濾過により分離した。この操作により、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cpm/ μ l の標識プローブが得られた。プローブに用いたアンチセンスHNは 5'-CTG CCC GCC TCT TCA CGG GCA GGT CAA TTT CAC TGG TTA AAA GTA AGA GAC AGC TGA ACC CTC GTG GAG CCA TGT GGT G-3' (配列番号: 3) である。cDNA断片は Ready-To-Go random labeling system (Amasham Pharmacia) により放射標識した。すなわち、50~500ng の変性させたDNA断片および 1.85MBq [α -³²P]dCTP を37°Cで30分インキュベートした後、標識されたDNA断片をゲル濾過により分離した。この操作により、約 5×10^7 cpm/ μ g DNA の標識プローブが得られた。ノーザンブロット解析は ExpressHyb (Clontech) を用いて行った。すなわち、プレハイブリダイゼーションの後、組織のポリA⁺-RNAがブロットされた膜 (ヒト組織の膜は Clontech より、マウス組織の膜は Origene より入手) を放射標識されたプローブ ($2 \sim 5 \times 10^7$ cpm) に18時間浸漬させた。説明書に従って2ステップの洗浄を行った後、増感スクリーンを2枚使って膜をX線フィルムに-70°Cで露光させた。

[実施例1] 発現cDNAライブラリーの構築

研究所のガイドラインに従って、生検により孤発性アルツハイマー病であることが確認された患者の脳試料 (後頭皮質) からポリA⁺ RNAを抽出し、発現ベクターに組み込み発現cDNAライブラリーを構築した。発現ベクターには、エロンゲーションファクタープロモーターを持つ哺乳動物細胞発現ベクター pEF-BOS (Mizushima and Nagata, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 5322) を用いた。ポリA⁺ RNAは、NotI部位を含む改変オリゴdTプライマーを用いて逆転写した。二本鎖cDNAにEcoRI-BstXIアダプタープライマー (5'-pGAA TTC ACC ACA-3' および 3'-CTT AAG GTGp-5') をライゲートし、NotIで切断した。低分子DNAを除いた後、cDNAは pEF-BOS

の BstXI-NotI 断片にライゲートし、エレクトロポレーションにより XL1 Blue MRF' 株へ形質転換した。初代ライブラリーサイズおよび挿入断片の平均サイズはそれぞれ 3.2×10^6 cfu/16ml および 0.9kb であった。

【実施例 2】 Humanin の同定

F11細胞は、E17.5のラット初代培養神経とマウス神経芽細胞腫 NTG18 を細胞融合させて樹立された、初代培養神経の不活化細胞モデルである(Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503)。分化刺激がなければ、この細胞は活動電位の生成などの初代培養神経に典型的な特徴を保持している (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503)。本発明者は、3種の FAD原因遺伝子である V642I/F/G APP をコードする cDNA を F11細胞にトランスフェクトすることにより、APPの V642 変異体の一過的な発現が細胞死を引き起こすことを見出した(Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352)。そこで本発明者は、最近開発されたエクダイソン誘導系 (No, D. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 3346-51) を用いて、V642I APP を誘導できるF11クローンの構築を行った。まず、エクダイソン受容体と RXR の両者を過剰発現する F11クローン (F11/EcR) を樹立し、この細胞に、エクダイソン応答配列の制御下に置かれた HSV プロモーターにより発現される V642I APP cDNA をコードする pIND-V642I APP を安定にトランスフェクションすることにより、V642I APPの発現を誘導することができる F11細胞を樹立した。このようにして樹立されたクローン F11/EcR/V642I 細胞は、そのままでは V642I APP をほとんど発現しないが、エクダイソン処理によりコンディショナルに V642I APP を過剰発現することが確かめられた。そしてエクダイソン処理に応答して、各 F11/EcR/V642I細胞で細胞死が誘導され、全F11/EcR/V642I細胞中の細胞死の比率は処理後 72 時間で 60~70%、処理後 96 時間で80~90%に達した。

これらの細胞を用いて、D' Adamio ら (D' Adamio, L. et al. (1997) Semin. Immunol. 9, 17-23) により開発された方法に基本的に従いながら、それに修正を

加えた「デストラップスクリーニング」を行った。最初に記載された「デストラップスクリーニング」においては、Vitoらは正常T細胞 cDNAライブラリーを Jurkat細胞にトランスフェクトし、T細胞受容体の刺激により細胞死を誘導し、細胞死をアンタゴナイズする遺伝子を回収した。本発明者は、デストラップスクリーニングを行い、AD遺伝子により誘導される細胞死をアンタゴナイズする遺伝子のスクリーニングを試みた。上記で作製したアルツハイマー病患者の脳試料から調製したcDNAを持つcDNA発現ライブラリーを F11/EcR/V642I 細胞にトランスフェクトし、この細胞をエクダイソンで 72 時間処理して生き残った細胞からプラスミドを回収した。この操作を3回繰り返し、最終的に約250クローンのプラスミドを得た。各プラスミドを用いたドットプロットハイブリダイゼーションにより、これらのクローンは互いにクロスハイブリダイズする 36 のグループに分類された。最も大きいグループは 28 のクローンからなっていた。

このグループの cDNA に着目し、各クローンのシーケンスを行った結果、このグループに属するクローンは総合すると、5' 配列は Wnt-13 の非コード領域と相同性があり、3' 配列は ミトコンドリア 16S リボソーム RNA と相同性があり、C末端にポリA領域を持つ1535bpの融合配列からなるcDNAをコードしていた。この配列全体は新規なものであった(図1)。各クローンの配列を決定したのち、各クローンの一過的なトランスフェクションが、pIND-V642I APP をコトランスフェクトした F11/EcR 細胞のエクダイソンにより誘導される細胞死を有意に抑制するかについてアッセイを行った。細胞死抑制活性を示した各々の配列を比較した結果、V642I APPにより誘導される細胞死をアンタゴナイズする活性は、新規な24アミノ酸のポリペプチド「MAPRGFSCLLLLTSEIDL PVKRRA」(配列番号: 5)をコードする 75bp のオープンリーディングフレーム (ORF) (5'-ATGGCTCCACGAGGGTTCAGC TGTCTCTTACTTTTAACCAAGTGAAATTGACCTGCCCGTGAAGAGGCGGGCATGA-3' /配列番号: 4)によりコードされていることが判明した。本発明者は、この分子を Humanin (HN) と名付けた。

〔実施例 3〕 FAD遺伝子により誘導される細胞死における各クローンの抑制効果

図 2～4 は、このグループに属する各クローンをコトランスフェクトしたときの効果を示す。F11/EcR 細胞 (EcR と RXR とを安定に発現する F11 クローンで、エクダイソンにより pIND プラスミドによりコードされる遺伝子の発現が誘導される) に V642I APP をコードする pIND を一過的にトランスフェクトしたところ、エクダイソンの非存在下 (V642I APP 非誘導条件) では、72 時間後に約 20% の細胞が細胞死を起こしたのに対し、エクダイソンの存在下 (V642I APP 誘導条件) では、有意に高い割合 (50～60%) の細胞が細胞死を起こした (図 2)。F11/EcR 細胞に、V642I APP をコードする pIND に加え、DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトすると、エクダイソン存在下でも、エクダイソンにより誘導される細胞死の有意な増加は観察されなかった。これとは対照的に、pEF-BOS、または DT171 をコードする pEF-BOS を細胞にトランスフェクトした場合には、エクダイソンに応答した細胞死の有意な増加が観察された。図 3 は、単純な一過的トランスフェクションを用いて 4 つの各 FAD 遺伝子 (V642I APP、NL APP、M146L PS-1、および N141I PS-2) により誘導される神経細胞死における DT63 の効果を確認した結果である。各 FAD 遺伝子 (V642I APP、NL APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 cDNA) をコードする pcDNA のいずれかに加え、空の pEF-BOS を F11 細胞にコトランスフェクションした場合、72 時間のインキュベーションにより 50～70% の細胞が細胞死を起こした。この条件におけるトランスフェクションの効率は約 60～70% であるため、各 FAD 遺伝子を発現する細胞の大部分が、トランスフェクト後 72 時間で細胞死を起こしたことになる。F11 細胞に、各 FAD 遺伝子に加え、DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトした場合、細胞死の増加は劇的に抑えられた。このことは、DT63 cDNA が 4 つの AD 遺伝子により誘導される細胞死すべてを、高い効率でアンタゴナイズすることを示している。図 4 は、HN の全配列を含む他の DT クローンや全配列を含まない他の DT クローン (DT29、DT44、および DT171

cDNA) の効果を示す。HN の全配列をコードするクローンである DT29 および DT44 では、各FAD遺伝子により誘導される細胞死の顕著な抑制が認められたが、HN の第一ATGコドンを持たない DT171 では、細胞死をアンタゴナイズする作用は認められなかった。これらのデータは、HN がコードする ORF が、4つのすべてのFAD 遺伝子による細胞死から神経細胞を保護することを示している。

そこで本発明者は、HN cDNAを pFLAG ベクターへサブクローニング (pHN) し、V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2の各々のFAD遺伝子による神経細胞死に対する pHN の効果を直接調べた。予想された通り、F11細胞に対する pHN のトランスフェクションは、毒性をほとんど示さないばかりか、各FAD遺伝子による毒性を解消させた (図5)。このアンタゴナイズ活性は、pHN により各FAD 遺伝子の発現が抑制されたことによるものではない。なぜなら、pHN のコトランスフェクションは、CMVプロモーターにより発現する EGFP の発現を変化させなかったことから (データ省略)、コトランスフェクトされた pHN は、同じ CMV プロモーターから発現される各FAD遺伝子の発現を変化させないことが示されたからである。さらに、V642I APP、NL-APP、および N141I PS-2 のイムノブロッティングによっても、各遺伝子の発現に pHN のコトランスフェクションがほとんど影響を与えないことが確認された (データ省略)。

[実施例4] HN の細胞外分泌

実験の過程で、pHNをトランスフェクトした F11 細胞の培養上清 (CM/F11-pHN) には、V642I APPを含むFAD遺伝子により誘導される細胞死を有意に抑制する活性があることが判明した。新鮮な培地または空のベクターである pFLAGをトランスフェクトしたF11細胞の培養上清 (CM/F11-vec) の存在下で V642I APP cDNAをトランスフェクトした F11細胞では高率で細胞死が誘導されたのに対し、CM/F11-pHN存在下で V642I APP cDNAをトランスフェクトした F11細胞では、細胞死が劇的に減少した (図6)。同じことがDTクローンについても観察された。CM/DT29およびCM/DT63は V642I APP により誘導される F11 細胞の細胞死を完全

に抑制したが、CM/DT171 は抑制しなかった。これは、HN または HN をコードする cDNA から転写される HN ポリペプチドは、培養液中に分泌され、V642I APP による誘導される細胞死を抑制することを示唆している。図 7 は、CM/F11-pHN 中の HN の免疫反応性を抗FLAG抗体で調べた結果を示している。CM/F11-pHN および pHN をトランスフェクトした細胞のライセートには、HN の免疫反応性を示す 3~4 kDa の単一のバンドを含んでおり、FLAG 融合 HN の予想される分子量 (3837Da; 図 7 左 および 中央) に一致していた。合成 FLAG 融合 HN ポリペプチド (MAPRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRAGTDYKDDDDK: 下線は FLAG タグ) (配列番号: 6) を用いて濃度を決定した結果、HN は CM/F11-pHN 中に 8~9 μ M の濃度で含まれていることがわかった (図 7 右)。これらの知見は、HN は pHN から転写され培養上清中に分泌されることを示している。

【実施例 5】 V642I APP により誘導される細胞死における合成 HN ポリペプチドの抑制効果

本発明者は次に、合成 HN ポリペプチド MAPRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRA (配列番号: 5) を合成し、V642I APP により誘導される神経細胞死において、このポリペプチドを細胞外から加えた場合の作用を調べた。F11細胞に V642I APP cDNA をトランスフェクトし、10 μ M の合成 HN ポリペプチド (sHN) 存在下で培養したところ、V642I APP により誘導される細胞死は劇的に抑制された (図 8)。10nM sHN では極弱い抑制を示すのみであったが、抑制作用は添加する sHN の濃度に依存しており、1~10 μ M のポリペプチドのレベルで完全な抑制に達した。IC₅₀ 値は約 100nM であった。この用量依存曲線は、CM/F11-pHN 中に分泌された HN が 約 10 μ M のレベルで V642I APP により誘導される細胞死を効果的に抑制した事実と一致している。

【実施例 6】 V642I APP により誘導される細胞死における HN ポリペプチドおよびその構造的誘導体の抑制効果

本発明者はさらに、sHN の細胞死抑制作用が特異的な一次構造によるものであ

るのかを検討した(図8)。ポリペプチドとして S14G (MAPRGFSCLLLLTGEIDLVPVKRRA : 下線のGはSから置換されている; HNGと称す) (配列番号: 7) を用いると、V642I APP により誘導される細胞死に対し、10nM以下の濃度において完全なアンタゴナイズ効果が認められ、IC₅₀ は約100pMであった。これに対して、C8A HN ポリペプチド (MAPRGFSALLLLTSEIDLVPVKRRA : 下線のAはCから置換された; HNAと称す) (配列番号: 8) は 100μM までの濃度において、V642I APP により誘導される細胞死を有意に抑制することはできなかった。8位の Cys が重要であることは、8位の Cys を介した HN のダイマー (C8-C8 HN) により得られた結果からも示唆された。C8-C8 HN のアンタゴナイズ作用のレベルは、元々の HN と HNAの間であった。また、対照的に、HN のC末端の KRRA を AAAA に置換した誘導体 (配列番号: 9) は、元々の HNポリペプチドと同様の作用能を示した。これらの結果は、HN の抑制活性に一次構造が本質的な役割をもつと共に、特定のアミノ酸残基が決まった役割を有していることを示している。

〔実施例7〕 FAD遺伝子により誘導される細胞死における HN ポリペプチドおよびその構造的誘導体の抑制効果

次に、他のFAD遺伝子、すなわち NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2 により誘導される細胞死に対する sHN、合成 HNG (sHNG)、および合成 HNA (sHNA) の効果を調べた。図9に示したように、元々の sHN は3つのFAD遺伝子のいずれにおいても同様の用量-応答特性を示し、1μM の濃度で各FAD遺伝子により誘導される神経細胞死を妨げた。sHNA は 100μM までの濃度において、いずれのFAD遺伝子による細胞死もアンタゴナイズしなかった。これに対し、sHNG は 10nM 以下の濃度で、各FAD遺伝子による細胞死を抑制する完全な活性を有していた。これは、HN の作用は S14G の置換により 100から1000倍に高められることを示している。V642I APP により誘導される細胞死に対する sHNG の作用 (図8) を合わせて考えると、sHNG は 10nM 以下の濃度で、4種の異なるタイプの FAD遺伝子により誘導される神経細胞死を、完全にアンタゴナイズできると結論され

る。

【実施例 8】 HN の細胞死抑制効果の特異性

HNの作用の特異性を明らかにするため、次に HN cDNA または HN ポリペプチドが、他の神経変性疾患の原因遺伝子により誘導される細胞死をアンタゴナイズすることができるかを調べた。72回の繰り返しを持つポリグルタミン Q79 は、ハンチントン病 (HD) や、ある種の脊髄小脳性運動失調症 (spinocerebellar ataxia; SCA) の原因になっていると考えられている (Ikeda, H. et al. (1996) Nat. Genet. 13, 196-202; Kakizuka, A. (1997) Curr. Opin. Neurol. 10, 285-90)。Q79の発現が神経細胞の細胞死を引き起こすことが報告されているように、Q79 の発現により F11 細胞は細胞死を起こした (図 10)。エクダイソンにより発現が誘導される Q79 プラスミド (pDN-E/G5H-Q79) を F11/EcR 細胞にトランスフェクトし、エクダイソンの存在下または非存在下で神経毒性の試験を行った。この系において、pDN-E/G5H-Q79 を空ベクター (pFLAG) と共に F11/EcR 細胞にトランスフェクションした場合は、エクダイソン処理に応答して細胞死の比率は顕著に増加した (図 10A)。F11/EcR 細胞に、pDN-E/G5H-Q79 を pHN、pHNG、または pHNA と共にトランスフェクトした場合でも、エクダイソン処理により、同じように高い比率の細胞死が誘導された。これに対し、エクダイソンにより誘導されるいずれのFAD遺伝子の発現により引き起こされる F11/EcR 細胞の細胞死も、pHNのコトランスフェクションにより効果的に抑制された (図 10B)。sHN を用いた実験においても、Q79により誘導される細胞死は抑制されなかった (図 10C)。F11/EcR 細胞に pDN-E/G5H-Q79 をトランスフェクトした場合、4 種のFAD遺伝子による F11/EcR 細胞の細胞死を sHN や sHNG が完全に抑制できる濃度の sHN、sHNG、または sHNA の存在下においても、非存在下における場合と同様、エクダイソンによって大幅な細胞死が引き起こされた (図 10D)。

本発明者はまた、家族性筋萎縮性側索硬化症 (familial amyotrophic lateral sclerosis; 家族性ALS) に関連した Cu/Zn依存性スーパーオキシドディスムタ

一ゼ (SOD1) の A4T、G85R、または G93A 変異体により誘導される神経細胞死に対する HN の効果を調べた。家族性ALS関連 SOD1 変異体の発現が哺乳動物神経細胞の細胞死を引き起こすという以前の報告 (Rabizadeh, S. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 3024-8; Ghadge, G. D. et al. (1997) J. Neurosci. 17, 8756-66) と一致して、これらすべての変異体において、それぞれの変異体を発現する cDNA を F11 細胞にトランスフェクトすることにより、有意に細胞死が引き起こされた。そして、各SOD1変異遺伝子に加え、pHNを F11 細胞にコトランスフェクトした場合でも、同様の高い細胞死が誘導された (図 1 1A)。図 1 1B に示したように、100 μ M の sHN、sHNG、または sHNA のいずれによっても、各家族性ALS関連 SOD1 変異体による細胞死の抑制は認められなかった。これらのデータは、HN は FAD 遺伝子により触発される細胞死実行機構を抑制する細胞内機構を活性化するが、他の神経変性疾患遺伝子による細胞死には機能しないことを示唆しており、HN cDNA および HN ポリペプチドのアンタゴナイズ効果は、ADに関連する神経細胞死に共通かつ特異的であることを証拠付ける。

【実施例 9】 初代神経培養の細胞死における HN の抑制効果

本発明者は、HN による、初代培養神経のADに関連する傷害からの保護について調べた。 $A\beta$ は老人斑の主要なペプチド成分で、AD脳を病理学的に特徴付ける細胞外沈着物であり、ADの病理機構に関与していると言われている (Selkoe, D. J. (1994) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-47; Cummings, J. L. et al. (1998) Neurology 51, S2-17; discussion S65-67)。 $A\beta$ 処理は初代培養神経の細胞死を引き起こすことが報告されている (Loo, D. T. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7951-7955; Gschwind, M. and Huber, G. (1995) J. Neurochem. 65, 292-300)。図 1 2 に示すように、初代培養皮質神経を 25 μ M の $A\beta$ 1-43 で 48 ~ 72 時間処理すると、N2 サプリメントの存在下または非存在下にて、軸索の異栄養変化 (dystrophic neuritic changes) を伴う広範な細胞死が引き起こされた。初代培養神経を 10 μ M の sHN で前処理すると、 $A\beta$ で誘導される細胞死と共に軸

索の異栄養変化が劇的に抑制された。 $A\beta$ 1-43処理により、トリパンブルー排除で測定した細胞死（図13左パネル）と、細胞から放出されたLDHにより測定した細胞傷害（図14）が観察されたが、 $10\mu\text{M}$ のsHN処理により、細胞の生存を示すこれらの指標はベーサルな状態で観察されたレベルに完全に回復した。同じ条件で、 100ng/ml のNGFは、 $A\beta$ により誘導される神経細胞の生存およびLDH放出の増加をアンタゴナイズする効果はなかった（データ省略）。 $A\beta$ により誘導される神経細胞死のアンタゴナイズにsHNが劇的な効果をあげたのに対して、 $10\mu\text{M}$ sHNで神経を同様に処理しても、初代培養神経に対する $20\mu\text{M}$ のエトポサイド（etoposide）の毒性を防ぐことはできなかった（図13右パネルおよび図14）。エトポサイドは抗癌剤であり、初代培養神経の細胞死を引き起こすことが報告されている（Nakajima, M. et al. (1994) Brain Res. 641, 350-2）。これらの知見は、HNは $A\beta$ 1-43により誘導される神経細胞死を、選択的な機構でアンタゴナイズするという考えを支持する。F11細胞を用いたFAD遺伝子の実験で指摘したのと同様に、 10nM sHNGは、 $A\beta$ 1-43による細胞死および軸索の異栄養変化から神経を完全に保護したが、 10nM sHNまたは $10\mu\text{M}$ sHNAは、いずれも $A\beta$ の神経毒性に対し効果を示さなかった（図12）。これらのデータは、細胞傷害のアッセイであるLDH放出アッセイ（図14）およびトリパンブルー排除アッセイ（図13）により確かめられたのみならず、生細胞のアッセイであるカルセイン（Calcein）染色アッセイ（図15および16）によっても確かめられた。このように、HNは初代培養神経においても、クローン化された神経細胞における場合と同様に効果を有していることが示された。さらに、これらのデータから、HNの構造を特異的に認識する受容体(群)が、F11細胞と初代培養神経に共通して存在していると考えることができる。

[実施例10] HN mRNAの発現

β -actin mRNAをポジティブコントロールとして、様々な組織におけるHN mRNAの発現を調べた。ヒト組織のノーザンブロット解析により、HN mRNAは心臓、骨格

筋、腎臓、および肝臓において顕著に発現していることが判明した（図17a）。それより少ないが、依然として有意な発現が脳および消化管（gastrointestinal tract）に認められた。胸腺、脾臓、および末梢血白血球を含む免疫系にはほとんどmRNAは検出されなかった。発現している主要なmRNAのサイズは約1.6kbであり、これは、HNを含む最も長いDT cDNAの予想されるサイズに相当する。約3kbおよび約1kbのサイズの異なるmRNAも存在した。HNの3'領域をコードし、HNをコードしていないDT77（図1参照）をプローブにした場合も、またHNの-440から-422の5'領域に対するアンチセンスプライマー（GGGTGTTGAGCTTGAACGC／配列番号：10）をプローブとした場合も、上記と同様の結果が得られ、これら全てのバンドが検出されたことから、これらのmRNAは全長HN mRNAとそのスプライシングバリエーションであると予想される。ヒト心臓cDNAライブラリーから、本発明者はDT44の位置と事実上同一であり、1kbpを超えるcDNAを幾つか単離した。マウス組織においても、以下の点を除き類似した結果を得た（図18）。第一点はマウスの骨格筋および肝臓はヒト組織に比べHN mRNA量が少なかったことである。しかしながら、他のマウスの骨格筋および肝臓のHN mRNAは多かった（データ省略）ことから、量的な差異は個体の条件が影響することが考えられる。第二点は、マウス心臓および腎臓において、1kbの小さなmRNAが、1.6kbのものと同等かそれ以上発現していることである。マウス脳、心臓、および骨格筋では特異的に、約0.4kbのmRNAがさらに発現していた。脳の発現領域を詳しく解析した結果、脳の各領域の中では、小脳および後頭葉で比較的多量のmRNAが発現していた。これらの結果は、HN mRNAは主に中枢神経系以外の器官で産生されていることを示している。このことからして、HNは血流に分泌され脳神経に運ばれている可能性が考えられる。または、脳内で局所的に合成されるHNが保護作用を発揮する可能性も想定される。これに関しては、AD脳で神経細胞死に対し最も抵抗力を示す領域である小脳および後頭葉でHN mRNAが最も合成されていることは興味深い。

産業上の利用の可能性

本発明によって、細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸またはポリペプチドを検索することを特徴とする、該疾患の抑制遺伝子または該疾患の抑制ポリペプチドのスクリーニング方法が提供された。疾患生物に由来する試料を用いることにより、該疾患に対する抑制遺伝子や抑制ポリペプチドを効率的にクローニングすることが可能となる。また、細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸およびポリペプチド、ならびに該核酸がコードするポリペプチドの疾患抑制効果を検査することにより、該核酸およびポリペプチドの特性を解析することができる。

請求の範囲

1. 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸またはポリペプチドを検索することを特徴とする、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法。
2. 疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法であって、
 - (a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、
 - (b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、
 - (c) 該効果を有する核酸を選択する工程、を含む方法。
3. 疾患抑制ポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法であって、
 - (a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞に投与する工程、
 - (b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、
 - (c) 該効果を有するポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸を選択する工程、を含む方法。
4. 工程(a)あるいはその前または後において該疾患に関連する細胞死を誘導し、工程(b)において該細胞死の抑制を指標に該疾患に対する抑制効果を検出する、請求項2または3に記載の方法。
5. 疾患が脳神経系疾患である、請求項1から4のいずれかに記載の方法。
6. 脳神経系疾患がアルツハイマー病である、請求項5に記載の方法。
7. 核酸またはポリペプチドが神経または脳に由来する、請求項1から6のい

れかに記載の方法。

8. 疾患に対する抑制効果を検査する方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、

(b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む方法。

9. 疾患に対する抑制効果を検査する方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞に投与する工程、

(b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む方法。

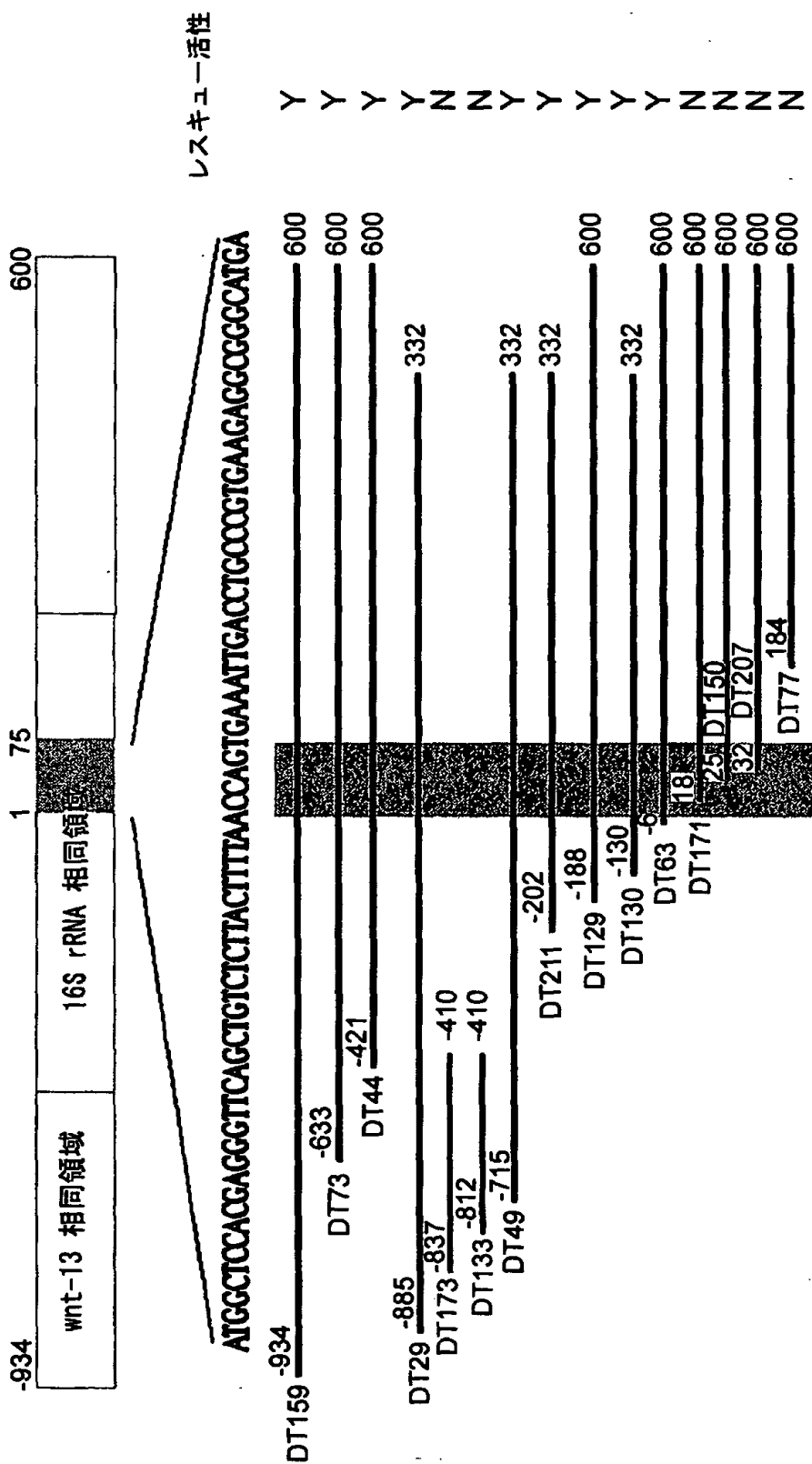
10. 工程(a)あるいはその前または後において該疾患に関連する細胞死を誘導し、工程(b)において該細胞死の抑制を指標に該疾患に対する抑制効果を検出する、請求項8または9に記載の方法。

11. 疾患が脳神経系疾患である、請求項8から10のいずれかに記載の方法。

12. 脳神経系疾患がアルツハイマー病である、請求項11に記載の方法。

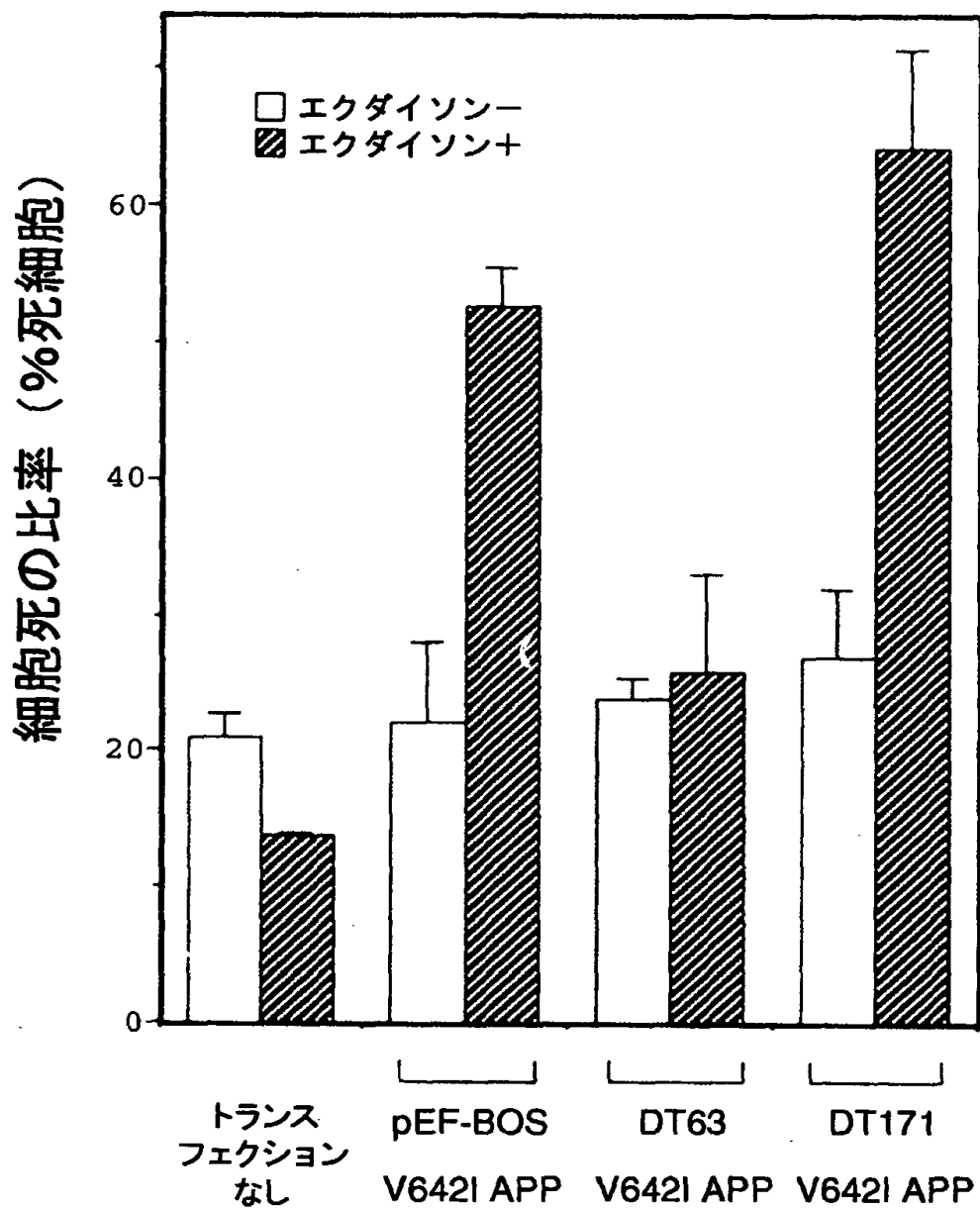
13. 核酸またはポリペプチドが神経または脳に由来する、請求項8から12のいずれかに記載の方法。

図 1



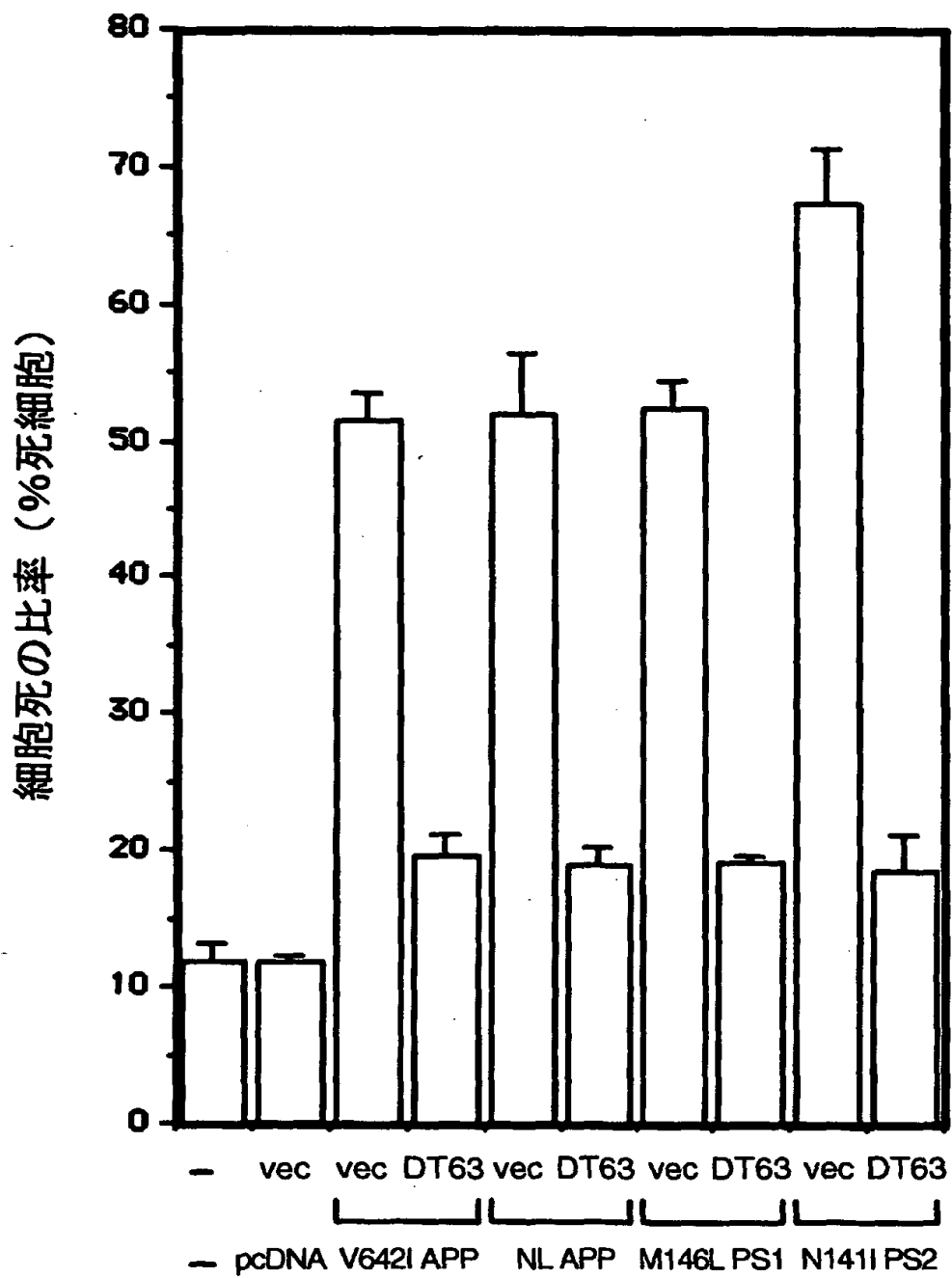
2 / 18

図 2



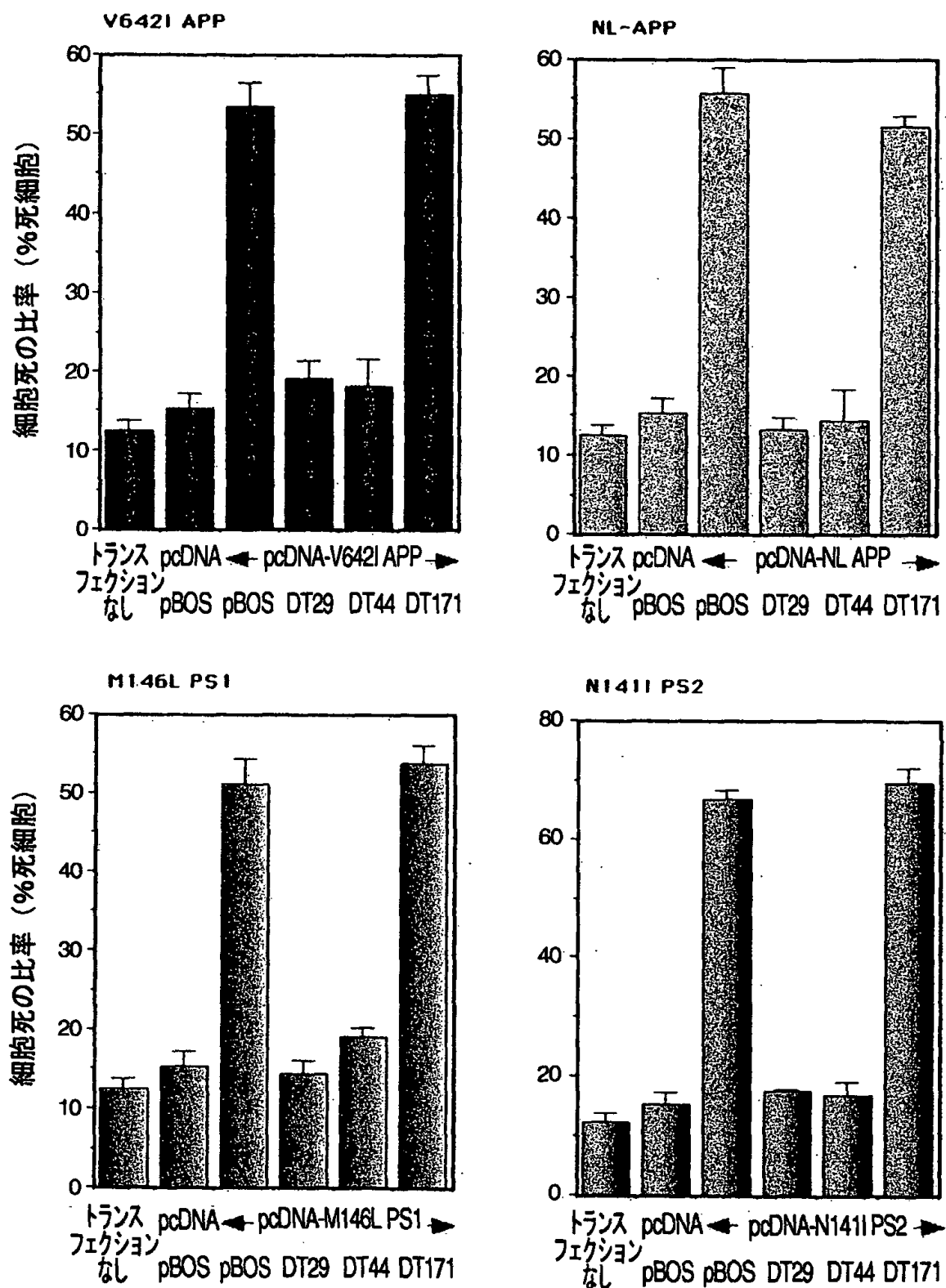
3 / 18

図 3



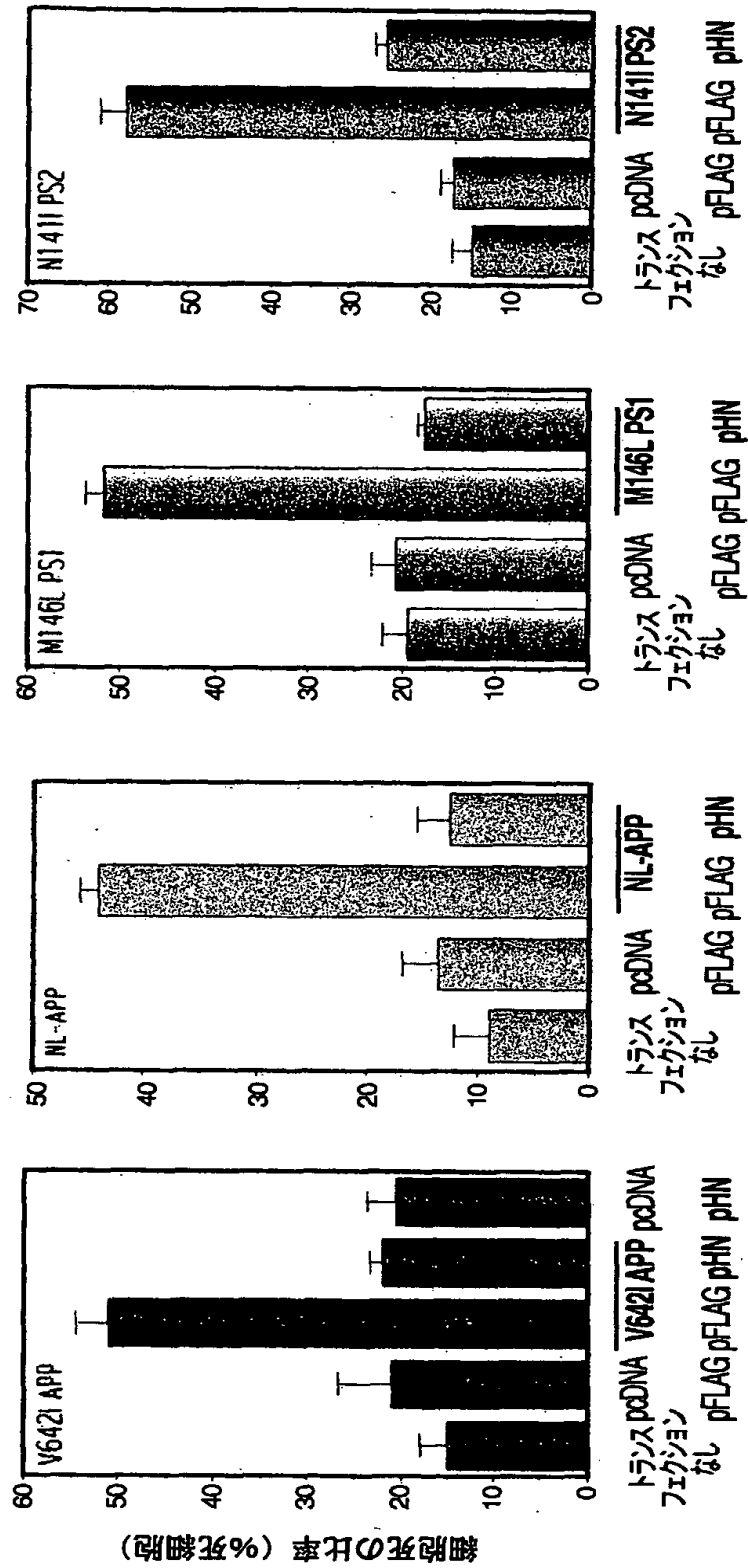
4 / 18

図 4



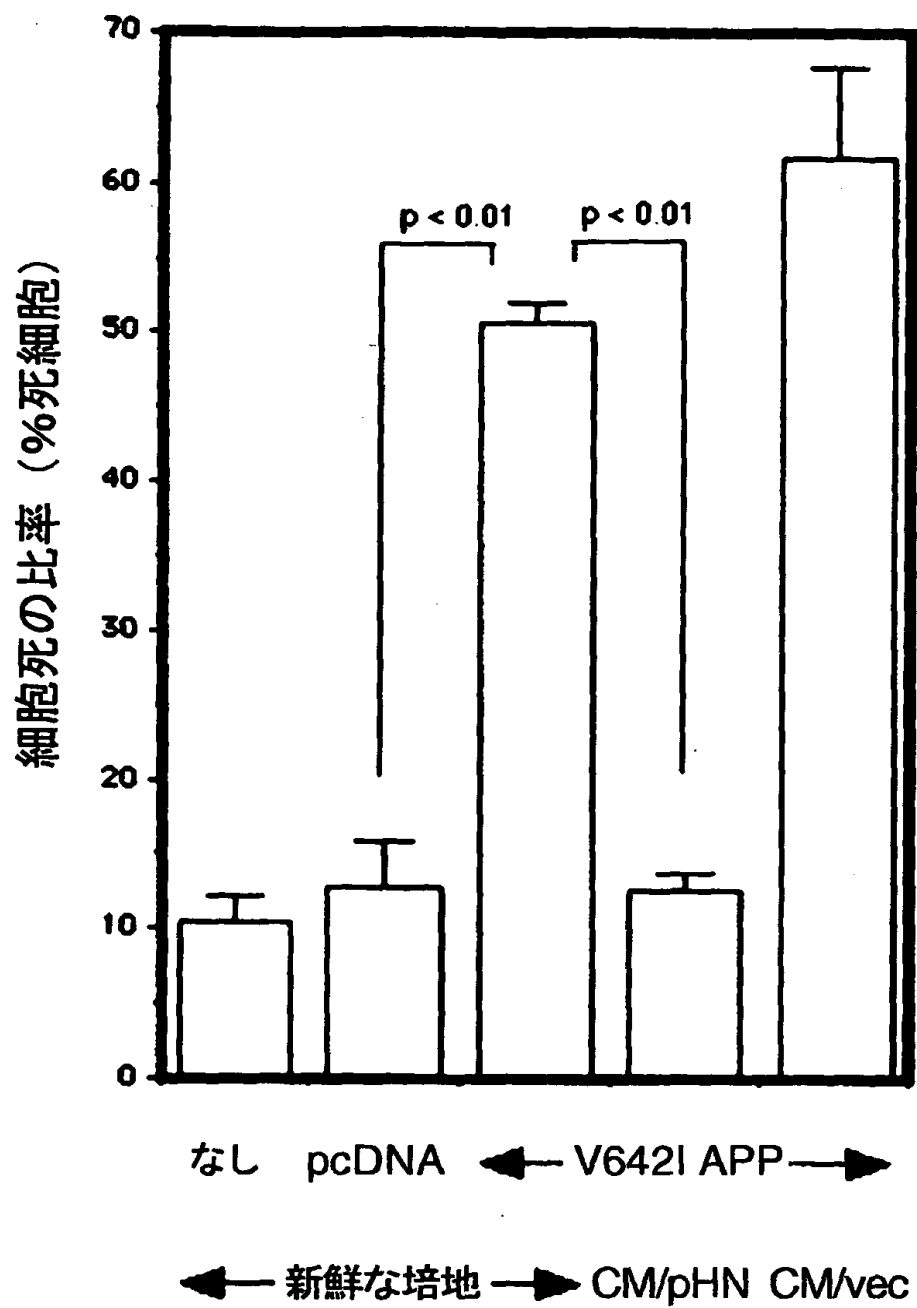
5 / 18

図 5



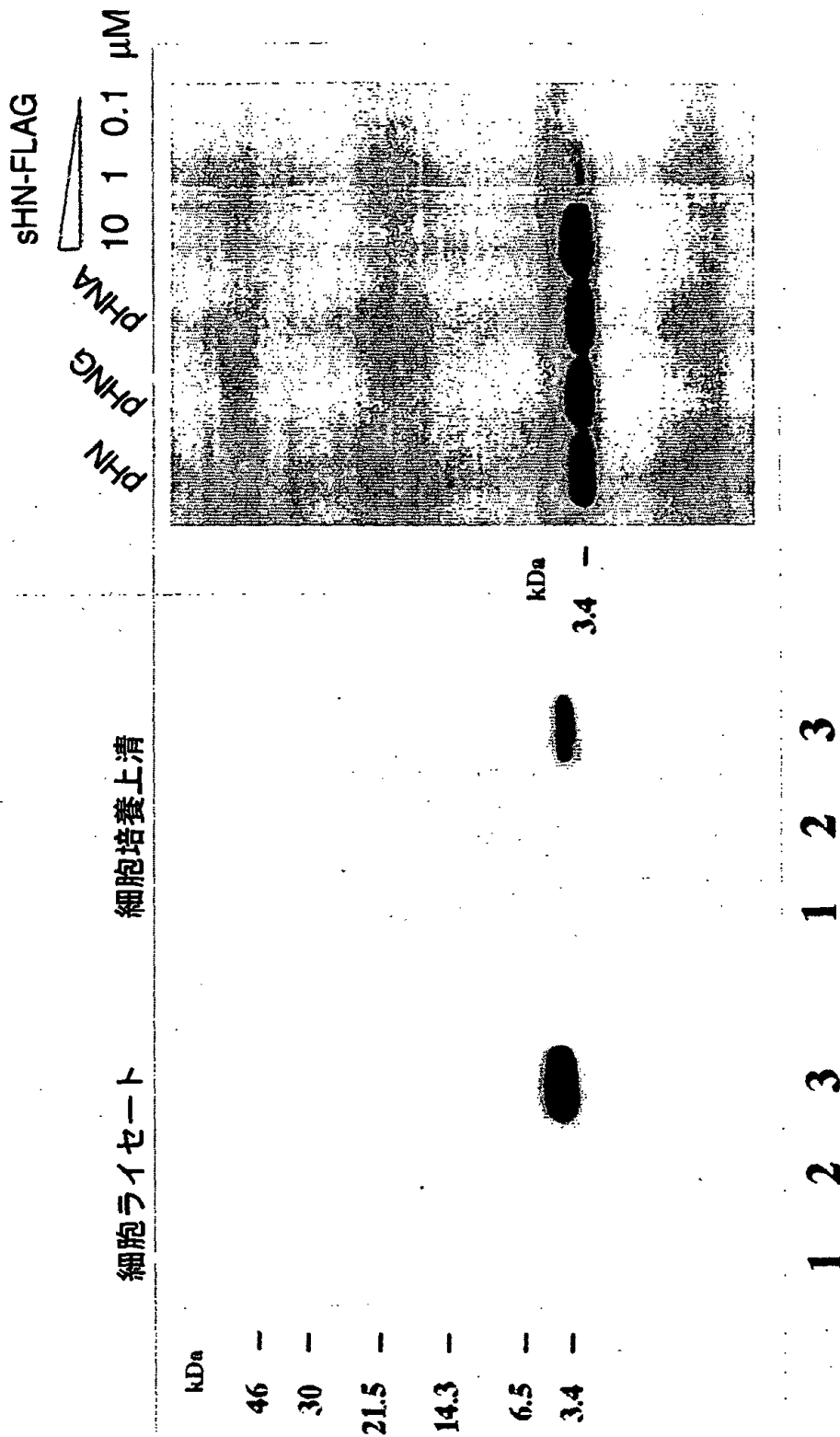
6 / 18

図 6



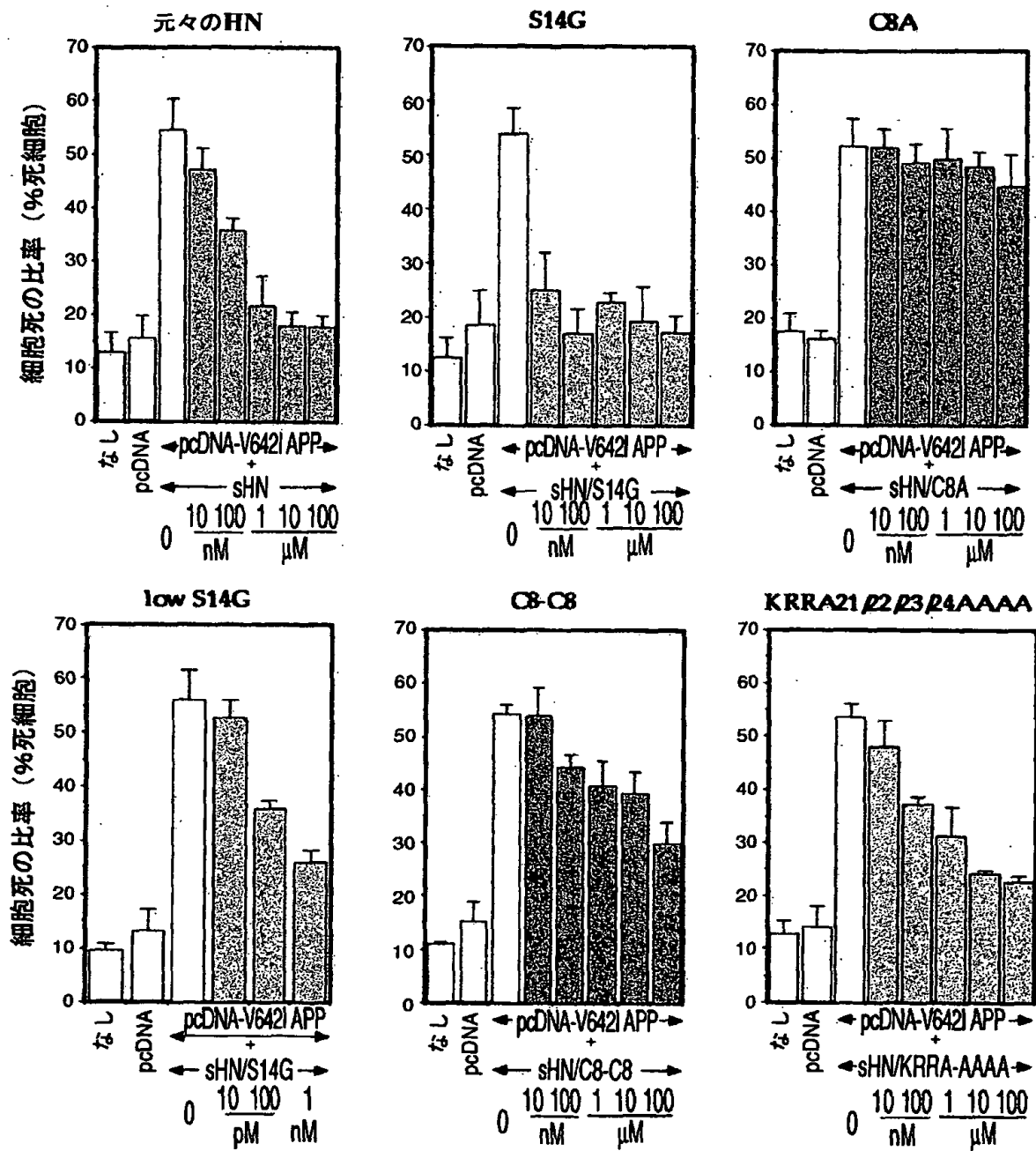
7 / 18

図 7



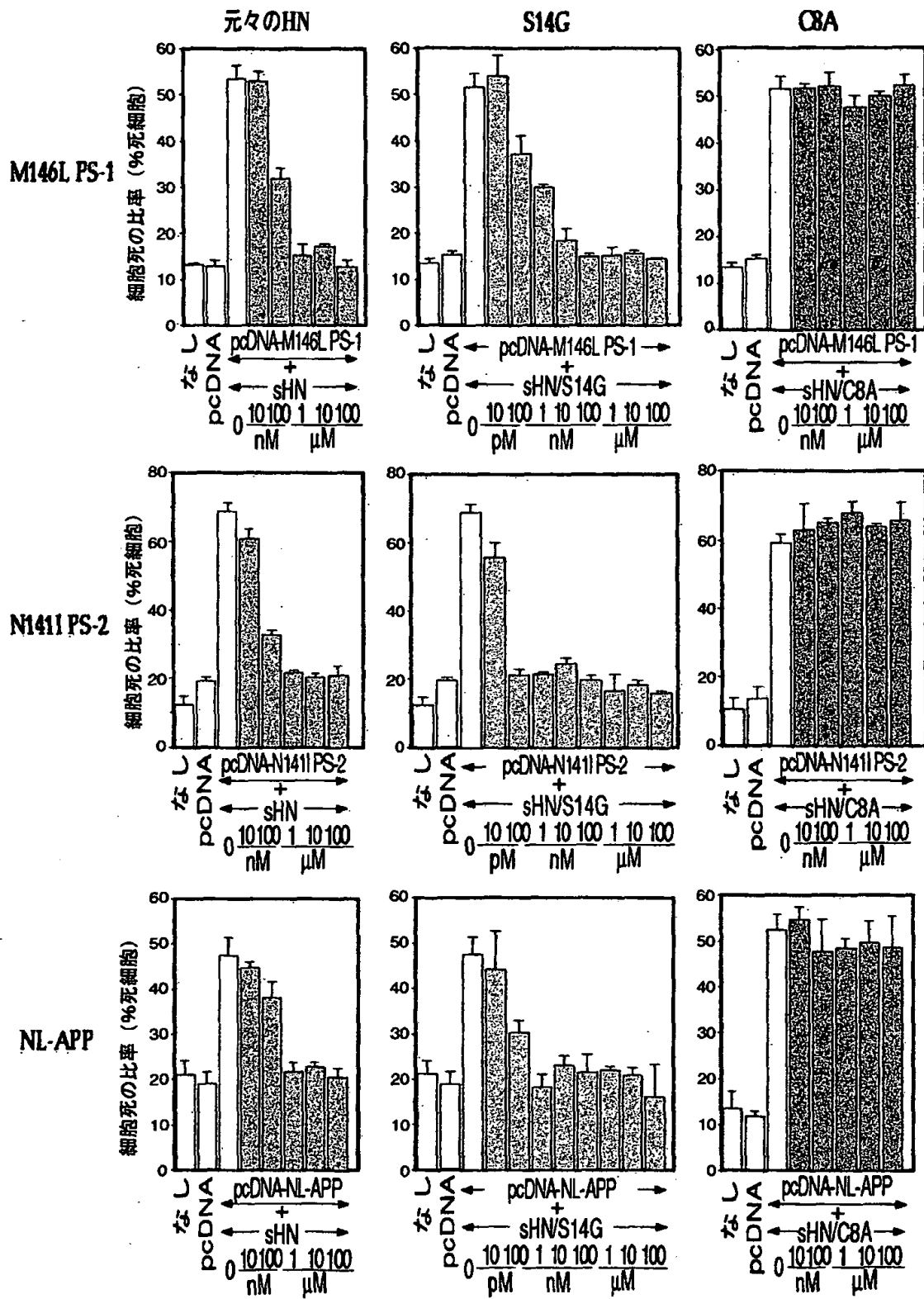
8 / 18

図 8



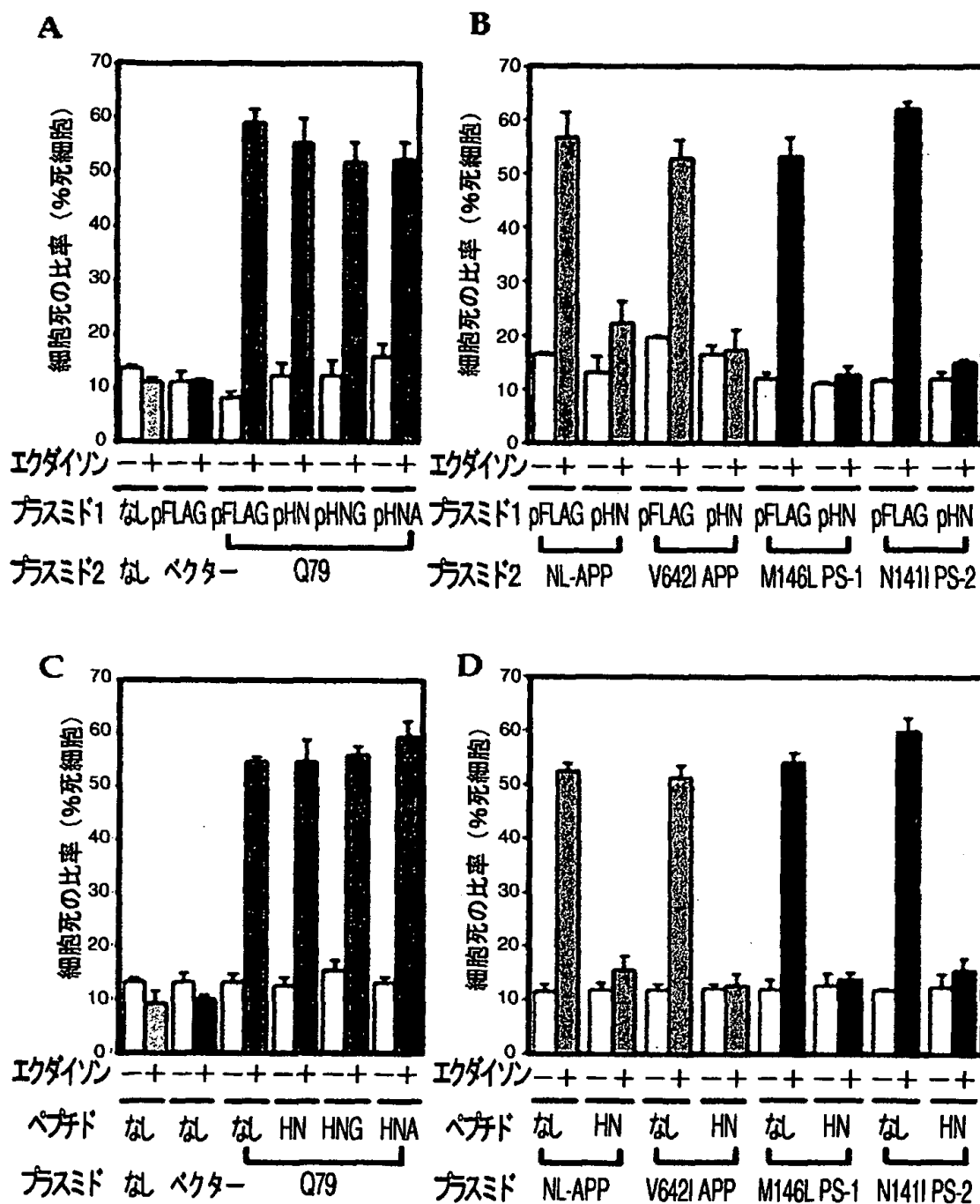
9 / 18

図 9



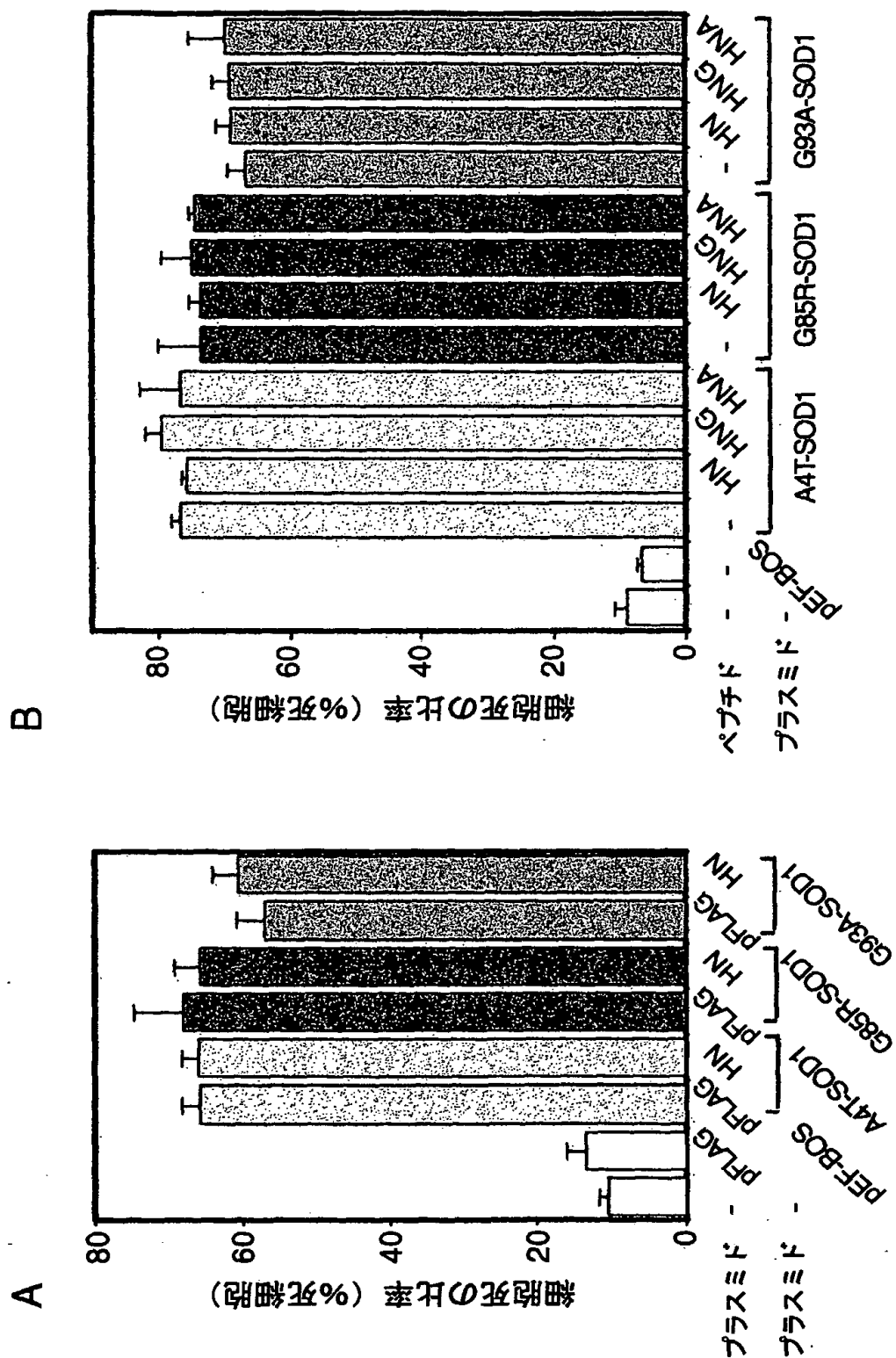
10/18

図10



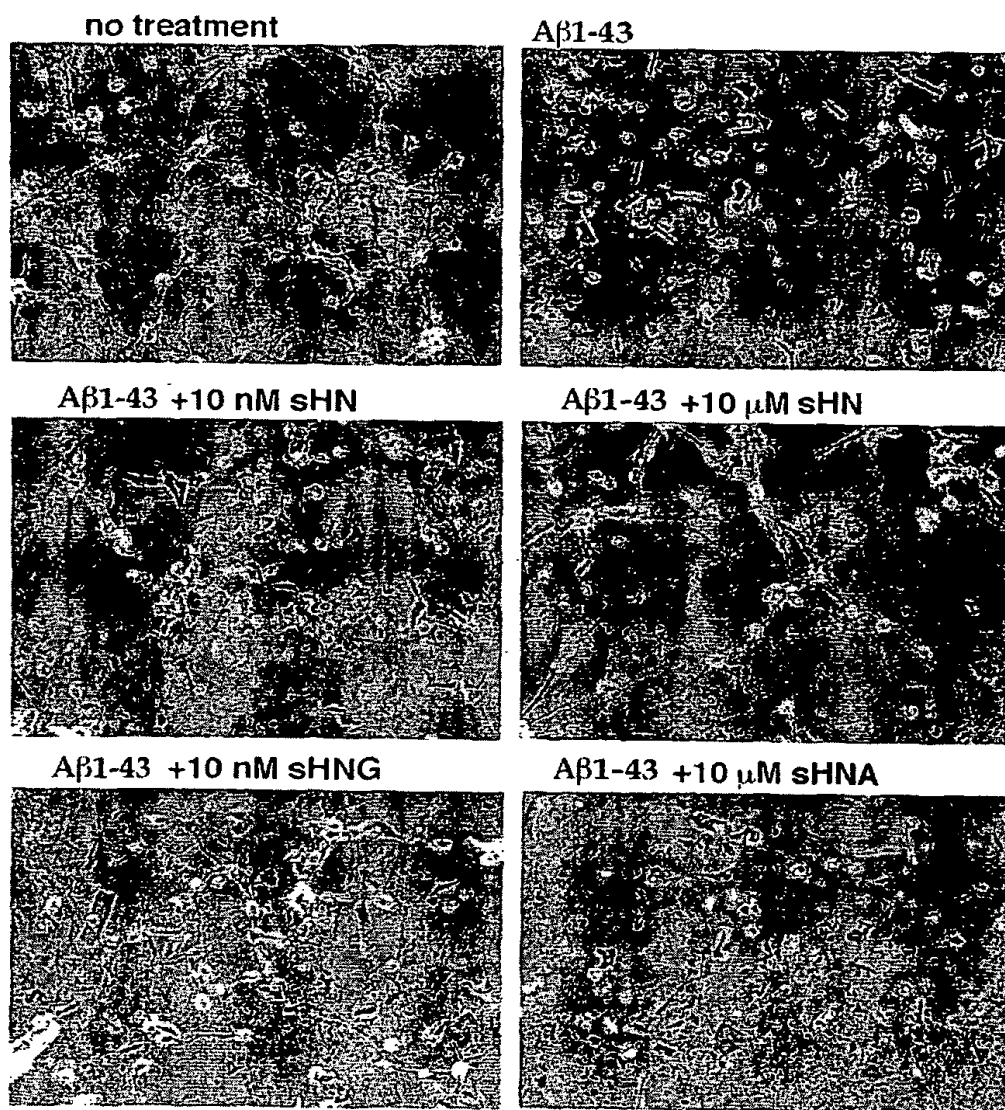
11/18

図 11



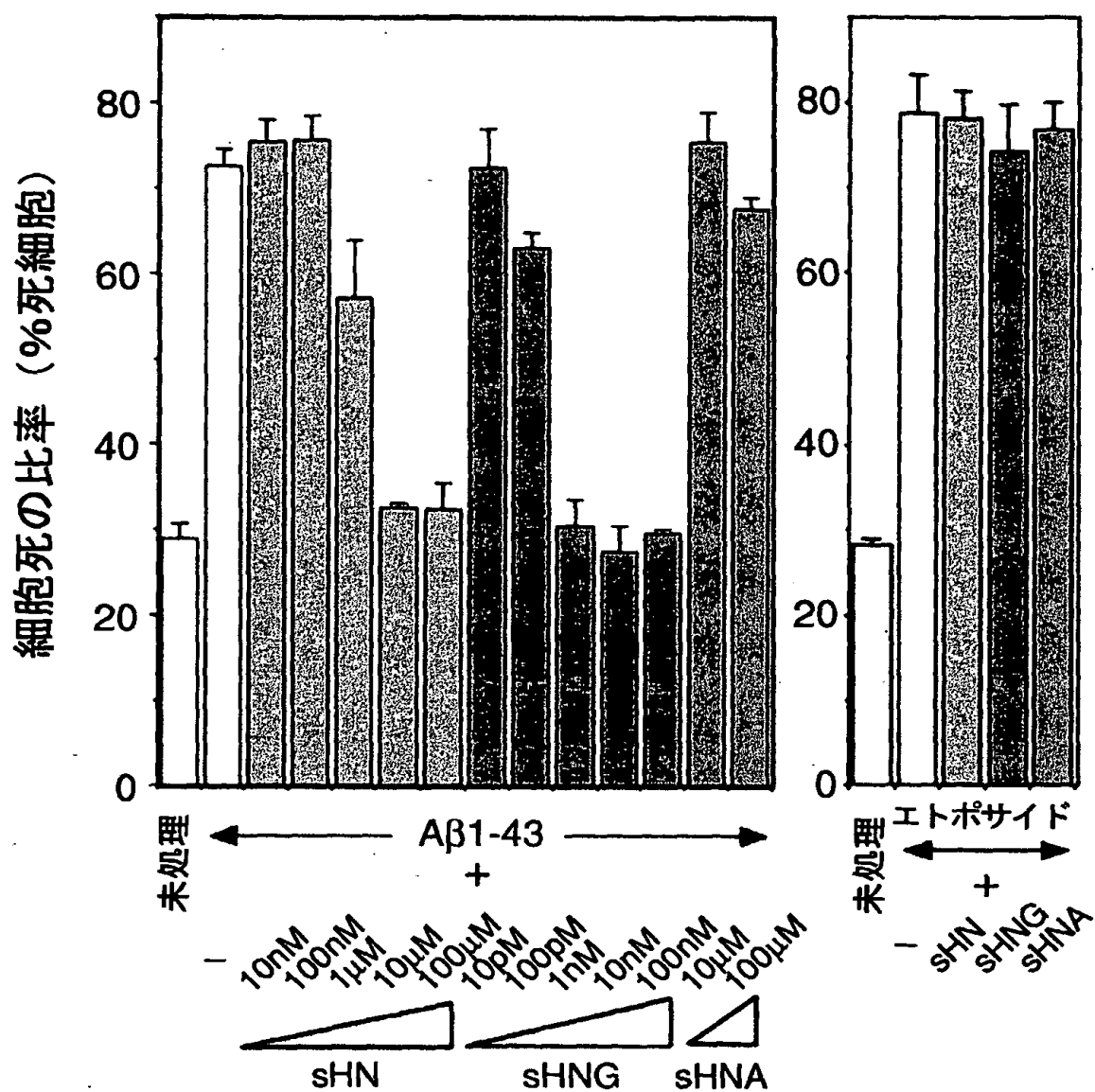
12/18

图 12



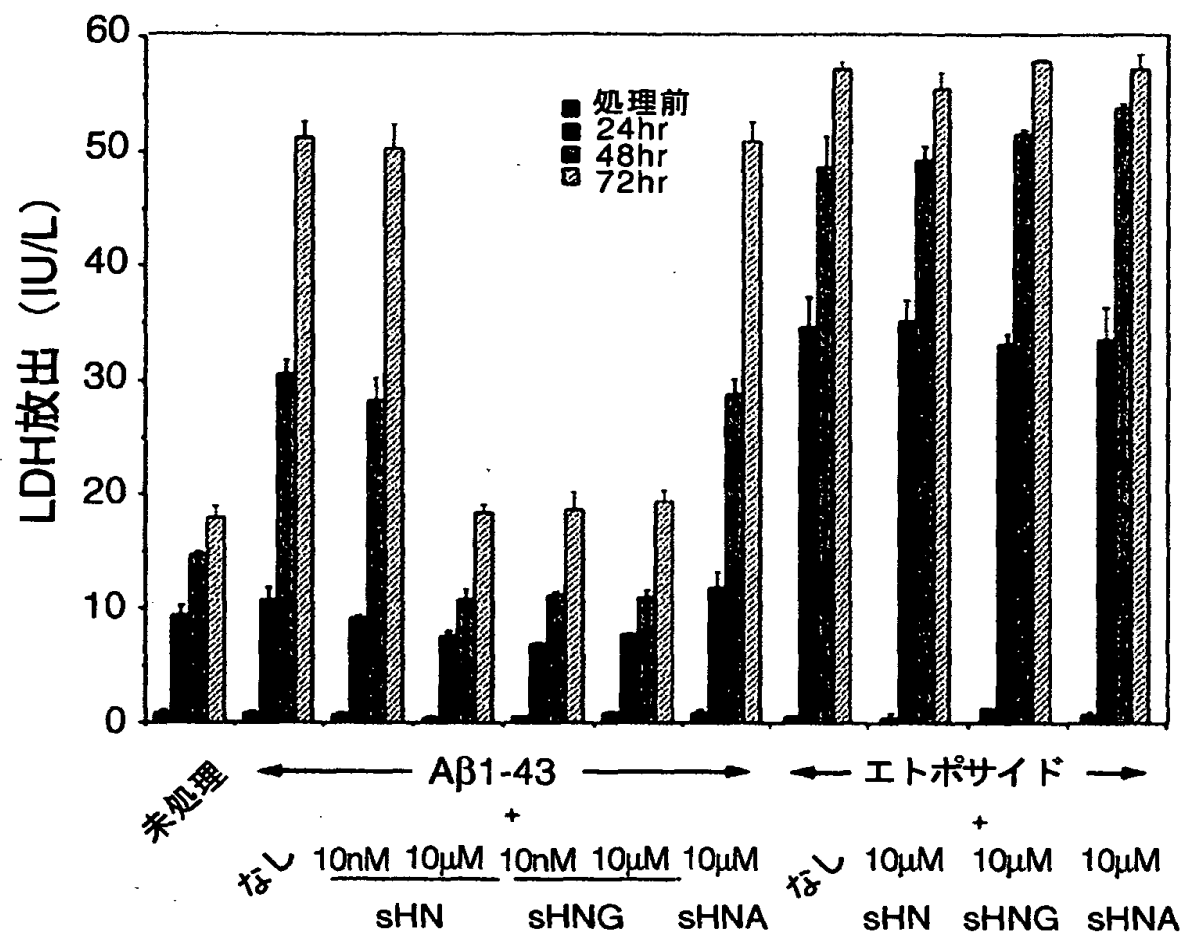
13/18

図13



14/18

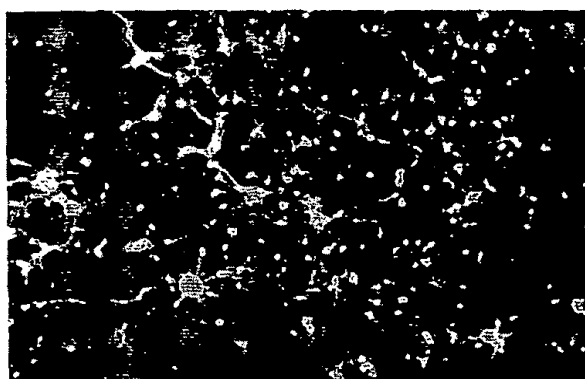
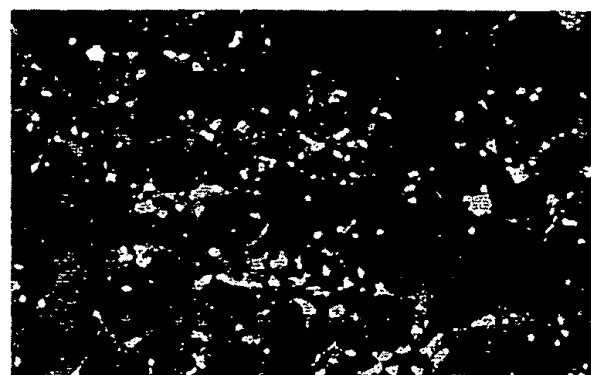
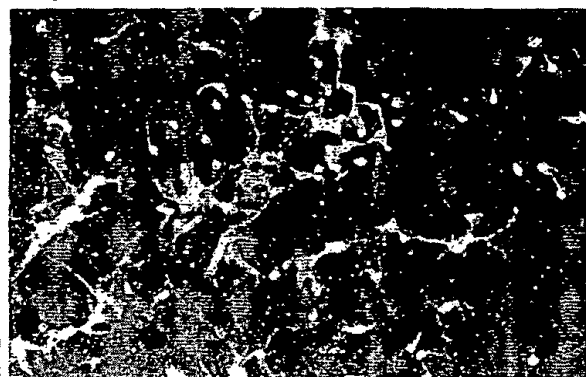
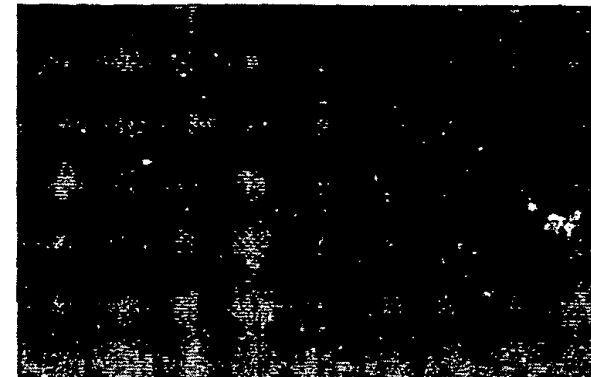
図14



15/18

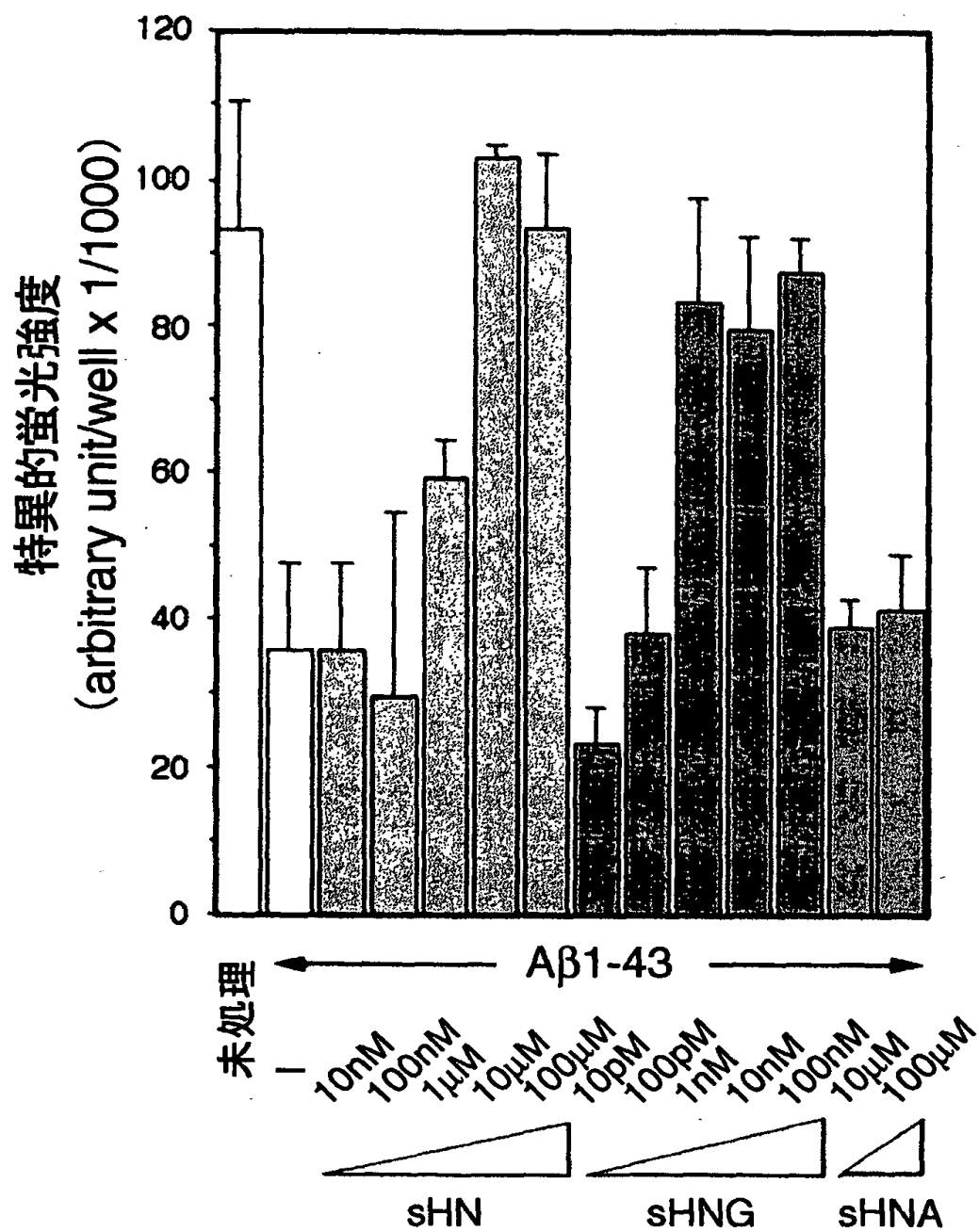
15

no treatment

A β 1-43A β 1-43 +10 nM sHNA β 1-43 +10 μ M sHNA β 1-43 +10 nM sHNGA β 1-43 +10 μ M sHNA

16/18

图 16



17/18

17

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

a kbp
4.4 —
2.4 —
1.35 —

c

4.4 —
2.4 —
1.35 —

b

4.4 —
2.4 —
1.35 —

d

2.4 —
1.35 —



18/18

18

1 2 3 4 5 6

kbp

2.4 ---

1.35 ---

0.24 ---

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

kbp

4.4 ---

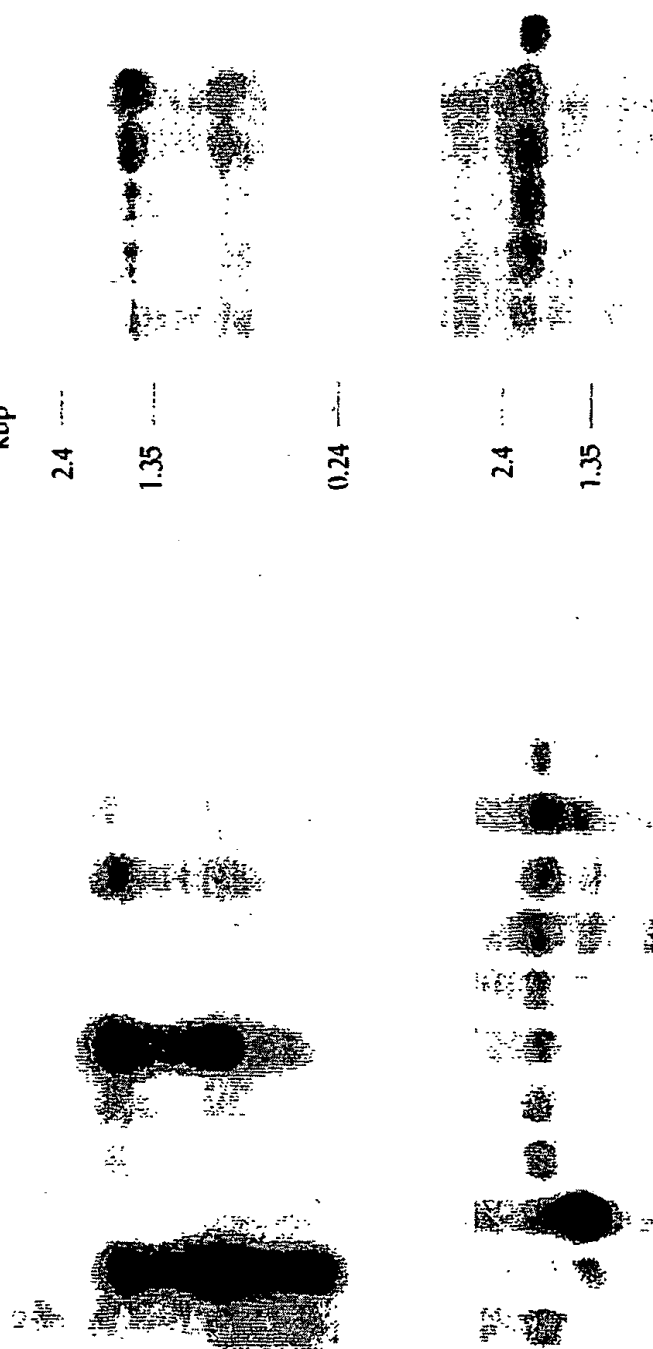
2.4 ---

1.35 ---

0.24 ---

2.4 ---

1.35 ---



SEQUENCE LISTING

<110> Keio University

<120> Methods for screening of disease-suppression genes

<130> KUV-102DP1PCT2

<140>

<141>

<150> JP 1999-264679

<151> 1999-09-17

<150> JP 2000-201456

<151> 2000-06-29

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 1

aattcaccat ggctccacga gggttcagct gtctcttact tttaaccagt gaaattgacc 60
tgcccgtgaa gaggcgggca ggtac 85

<210> 2

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 2

ctgcccgcct cttcacgggc aggtcaattt cactgggttaa aagtaagaga cagctgaacc 60
ctcgtggagc catggtg 77

<210> 3

<211> 79

2/4

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 3

ctgcccgcct cttcacgggc aggtcaattt cactgggttaa aagtaagaga cagctgaacc 60
 ctcgtggagc catgtggtg 79

<210> 4

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(72)

<400> 4

atg gct cca cga ggg ttc agc tgt ctc tta ctt tta acc agt gaa att 48
 Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
 1 5 10 15

gac ctg ccc gtg aag agg cgg gca tga 75
 Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
 20

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
 1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
 20

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

3/4

synthesized sequence (sHN-FLAG)

<400> 6

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala Gly Thr Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
20 25 30

Asp Lys

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (HNG)

<400> 7

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (HNA)

<400> 8

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Ala Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 9

Met	Ala	Pro	Arg	Gly	Phe	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Ser	Glu	Ile
1				5				10						15	

Asp	Leu	Pro	Val	Ala	Ala	Ala	Ala
			20				

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 10

gggtgttgag cttgaacgc

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12Q1/02, 1/68, A61K38/10, 38/17
A61P25/28, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/00-/15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 616032, A1 (MITSUBISHI KASEI CORP), 21 September, 1994 (21.09.94), Full text & JP, 6-329551, A & US, 5837853, A	1-13
A	JP, 11-146743, A (Japan Science and Technology Corp.), 02 June, 1999 (02.06.99), Full text (Family: none)	1-13
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, March 1998 Qing Guo et al., "Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: Reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function", pp.3227-3232	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 December, 2000 (12.12.00)

Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/02, 1/68, A61K38/10, A61K38/17
A61P25/28, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 616032, A2 (MITSUBISHI KASEI CORP) 21. 9月. 1994 (21. 09. 94) 全文 & JP, 6-329551, A & US, 5837853, A	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 11-146743, A (科学技術振興事業団) 2. 6月. 1999 (02. 06. 99) 全文 (ファミリーなし)	1-13
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, March 1998 Qing Guo et al., "Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: Reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function", p. 3227-3232	1-13